

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
18 septembre 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/076632 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 15/82, C07K 14/415, A01H 5/10

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR03/00711

(22) Date de dépôt international : 5 mars 2003 (05.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/02968 8 mars 2002 (08.03.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BIO-  
GEMMA [FR/FR]; 1 rue Edouard-Colonne, F-75001  
PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : PEREZ,  
Pascual [FR/FR]; 17 Chemin de la Pradelle, F-63450  
CHANONAT (FR). GERENTES, Denise [FR/FR]; 48,  
route de la Roche-Blanche, F-63450 LE CREST (FR).  
LEVADOUX, Sylvain [FR/FR]; 2, rue des Vignes,  
F-63140 CHATEL-GUYON (FR).

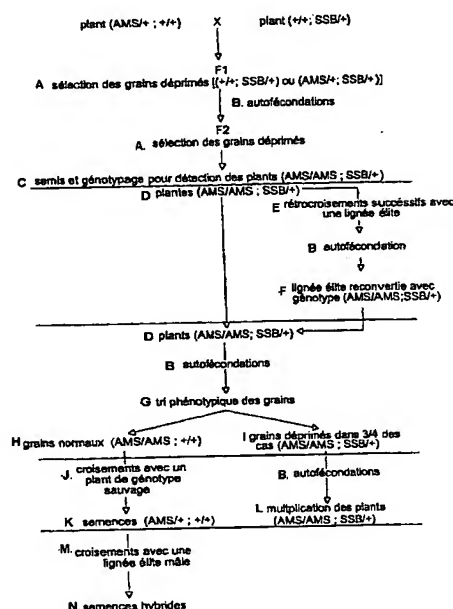
(74) Mandataires : BERNASCONI, Jean etc.; CABINET  
LAVOIX, 2, Place d'Estienne d'Orves, F-75441 PARIS  
CEDEX 09 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: NOVEL METHOD FOR THE PRODUCTION OF HYBRID MAIZE SEEDS

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE SEMENCES HYBRIDES DE MAIS



A... SELECTION OF DEFICIENT SEEDS  
B... AUTOFERTILISATION  
C... SOWING AND GENOTYPING TO DETECT PLANTS  
D... PLANTS  
E... SUCCESSIVE RETROCROSSINGS WITH AN ELITE LINE  
F... ELITE LINE CONVERTER WITH A GENOTYPE  
G... PHENOTYPE SEPARATION OF SEEDS  
H... NORMAL SEEDS  
I... DEFICIENT SEEDS IN 3/4 OF CASES  
J... CROSSINGS WITH A PLANT WITH WILD GENOTYPE  
K... SEEDS  
L... PLANT MULTIPLICATIONS  
M... CROSSING WITH AN ELITE MALE LINE  
N... HYBRID SEEDS

(57) Abstract: The invention relates to a method for production and multiplication of maize plants homozygous for a transgene which confers male sterility, useful in the production of hybrid maize seed.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de production et de multiplication de plants de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle, utiles pour la production de semences hybrides de maïs.



SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

## PROCEDE DE PRODUCTION DE SEMENCES HYBRIDES DE MAIS

La présente invention concerne un procédé de production et de multiplication de plants de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle, utiles pour la production de semences hybrides de maïs.

La production d'hybrides via « l'hybridation sexuelle » des parents ayant des fonds génétiques différents est de grande importance dans la pratique de l'agriculture moderne. En effet, le croisement entre plantes de même espèce mais non apparentées produit une descendance qui manifeste des caractères, tels que le rendement ou la résistance aux maladies, supérieurs à ceux des parents : il s'agit de l'effet d'hétérosis ou de vigueur hybride. Ainsi la production d'hybrides est-elle souvent utilisée afin d'améliorer à la fois la qualité et le rendement des plantes cultivées.

De plus, ces descendants sont génétiquement uniformes, notamment pour les caractères que sont la productivité, la sensibilité à la verse et à la sécheresse, la vigueur au départ et la sensibilité aux maladies et aux ravageurs, et donc intéressants pour les agriculteurs.

Sans intervention humaine, la production d'hybrides est limitée par les phénomènes d'autofécondation. La production de semences hybrides nécessite donc de privilégier la fécondation croisée en empêchant l'autopollinisation par des techniques mécaniques, chimiques ou génétiques. Les différentes voies permettant d'empêcher l'autofécondation en contrôlant la pollinisation incluent notamment:

- la "castration" manuelle, mécanique ou l'inactivation chimique des organes mâles de la plante,
- l'utilisation d'une plante modifiée présentant une stérilité mâle nucléaire récessive,
- l'utilisation d'une plante modifiée présentant une stérilité mâle cytoplasmique récessive,
- l'utilisation d'une plante mâle stérile nucléaire dominante (stérilité mâle artificielle ou AMS).

Cependant, certaines de ces techniques ne sont pas totalement efficaces et parfois même difficiles à mettre en œuvre.

La "castration" coûte cher et peut provoquer des pertes de rendement en cas d'erreur.

L'efficacité de l'emploi d'agents chimiques, moins onéreux, dépend des conditions environnementales au moment de l'application du gamétocide, ce qui amène le producteur de semences à prendre des risques considérables à chaque saison.

L'utilisation d'une plante mâle stérile nucléaire récessive n'est pas facile à mettre en œuvre, notamment en raison du maintien du caractère mâle stérile qui nécessite la resélection de plantes mâles stériles dans les descendants obtenus par autofécondation d'une plante hétérozygote pour le gène de stérilité mâle récessif. Pour être efficace, ce système implique donc l'utilisation d'un marqueur étroitement lié au gène de stérilité mâle et facilement identifiable.

La stérilité mâle peut être "acquise", c'est-à-dire qu'elle est indépendante d'une quelconque manipulation génétique par la voie de l'ADN recombinant. On peut distinguer la stérilité mâle cytoplasmique de la stérilité mâle nucléaire.

La stérilité mâle "cytoplasmique" ("CMS") est liée à des changements dans l'organisation et l'expression du génome mitochondrial, la stérilité mâle nucléaire résulte de mutations dans le génome du noyau de la cellule. Cependant la CMS n'est pas complète, 2/1000 des plantes restant fertiles. La perte de la diversité génétique cytoplasmique lorsque les sélectionneurs utilisent le même cytoplasme dans leurs programmes de sélection peut être par ailleurs un handicap.

La stérilité mâle peut être "artificielle" ("AMS"), c'est-à-dire qu'elle est induite par l'expression d'un gène conférant la stérilité mâle (gène AMS) qui est inséré soit dans le génome mitochondrial (stérilité mâle cytoplasmique), soit dans le génome nucléaire (stérilité mâle nucléaire).

Le système AMS permet d'éviter les problèmes associés aux autres méthodes. En effet, contrairement à la CMS, le système AMS ne dépend pas de l'existence d'un mutant. Le maintien du caractère stérile de la lignée mâle peut être obtenu grâce à l'utilisation d'un gène de stérilité mâle dominant lié à un gène marqueur qui permet la sélection des plantes mâles stériles artificielles.

Le problème du maintien du caractère mâle stérile dans une lignée de plantes a été en partie résolu dans la demande de brevet WO 95/34634 qui prévoit le croisement entre une plante hétérozygote pour un gène dominant de stérilité mâle et



une plante restauratrice de la fertilité puis la sélection des semences mâles stériles. Dans cette demande, l'utilisation d'un marqueur, lié au gène restaurateur de la fertilité, influant sur la régulation des gènes codant les enzymes de régulation de la synthèse des anthocyanes permet de différencier par la couleur les semences mâles stériles des semences mâles fertiles.

Cependant, le système de tri décrit dans cette demande de brevet ne permet pas de réaliser de façon fiable un tri de semences hybrides à grande échelle.

D'autre part, l'application générale de cette technologie est limitée dans la mesure où le choix du marqueur de coloration est conditionné par le génotype de la plante contenant le gène de restauration de la fertilité. En particulier, seules des plantes dont le génotype ne conditionne pas une production visible d'anthocyanine dans les semences peuvent être utilisées.

La présente invention propose donc un procédé de production et de multiplication de plants de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle, permettant une production de semences hybrides, et facilement applicable à grande échelle. Un avantage du procédé proposé est que son application n'est pas conditionnée par le génotype des plantes utilisées.

Cette approche repose notamment sur l'association du caractère de fertilité à un phénotype "petit grain". Le phénotype "petit grain" est préférentiellement obtenu par l'expression des gènes *shrunk 2* et *brittle 2* en orientation antisens. Le gène *brittle 2* code l'une des 2 sous-unités de l'ADP glucose pyrophosphorylase, une enzyme intervenant dans la synthèse de l'amidon. Le fragment a été obtenu par la technique de RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN totaux d'épi de maïs et d'après les données de Genbank (n° acc. S72425). Ce fragment représente un ADNc incomplet du gène *brittle 2*. Le gène *shrunk 2* code l'autre sous-unité de l'ADP glucose pyrophosphorylase. Le fragment a été obtenu par la technique de RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN totaux d'épi de maïs et selon les données de Genbank (n° acc. S72425). Ce fragment contient la séquence complète de la région codante du gène *shrunk 2*.

L'inhibition de ces deux gènes de mutants ridés de taille et de poids inférieurs permet d'obtenir des grains de maïs de densité et/ou de taille inférieure. De tels grains peuvent être facilement triés par tamisage et/ou tri densimétrique, par exemple à l'aide d'une table ou colonne densimétrique, ou par flottaison, ce qui

permet la mise en œuvre d'une sélection fiable, simple, et automatisée et donc applicable à grande échelle.

5 Dans le cadre de la présente invention, on désigne par "hétérozygote pour le transgène AMS" un plant de maïs rendu mâle stérile par incorporation dans son génome d'une seule copie d'un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"). En l'absence d'autre indication, ce plant ne contient pas le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

10 Dans le cadre de la présente invention, on désigne par "homozygote pour le transgène AMS" un plant de maïs rendu mâle stérile par incorporation dans son génome de deux copies situées au même endroit sur chacun des chromosomes frères d'un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle (AMS). En l'absence d'autre indication, ce plant ne contient pas le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

15 Par "plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain"" on entend un plant de maïs hétérozygote ou homozygote pour ledit gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Préférentiellement, ledit plant de maïs est hétérozygote. En l'absence d'autre indication, ce plant ne contient pas de transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle (AMS).

20 Par "plant de maïs comprenant dans son génome un transgène AMS" on entend un plant de maïs hétérozygote ou homozygote pour ledit transgène AMS.

25 Par "plant de maïs de génotype sauvage", on entend un plant de maïs qui ne contient dans son génome ni un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle (AMS), ni un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". De manière préférentielle, ledit plant de maïs de génotype sauvage appartient à une lignée élite.

30 Par phénotype "petit grain" on entend des grains dont la densité et/ou la taille et/ou la masse est (sont) inférieure(s) à celle(s) d'un grain de taille normale, préférentiellement de 40 à 50 % inférieure. Dans le cadre de la présente invention, ces grains pourront être appelés "grains déprimés" ou "grains ridés".

Par "marqueur de phénotype petit grain" ou "gène qui confère un phénotype petit grain" ou "gène codant un phénotype petit grain", on entend tout gène, en orientation sens ou en orientation antisens, qui, lorsqu'il est exprimé dans la plante

confère un phénotype "petit grain". Parmi ces marqueurs peuvent être notamment cités les gènes *shrunk 2*, *brittle 2*, *shrunk 1*, le locus miniature 1 qui code une invertase ; et plus généralement tout gène qui permet de diminuer le contenu en amidon et n'altère pas la viabilité des grains.

5 Par "grain de taille normale" ou "grain normal" ou "grain de phénotype normal", on entend notamment un grain dont la taille et/ou la densité et/ou la masse n'a(n'ont) pas été modifiée(s), en particulier par intégration dans le génome de la plante d'un marqueur de phénotype "petit grain".

10 Par "lignée élite", on entend une lignée présentant un potentiel agronomique et commercial important, à une période donnée.

Par "liaison" ou "liaison génétique", on entend une distance génétique suffisamment faible pour que les fréquences de recombinaison au cours de la méiose soient négligeables.

15 Par "protéine d'intérêt", on entend une protéine d'origine humaine ou animale pouvant présenter un intérêt thérapeutique et/ou prophylactique, telle que le collagène, la lipase gastrique, des anticorps, etc.

20 L'un des buts de l'invention est donc de proposer un procédé de production de semences hybrides de maïs par croisement d'un plant de maïs hétérozygote pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") avec un plant de maïs de génotype sauvage. Le système selon la présente invention, qui permet avantageusement de maintenir le caractère mâle stérile de plants de maïs est applicable indépendamment du génotype des plants de maïs utilisés.

25 La solution apportée par l'invention consiste à produire dans un premier temps des semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". A partir de ces semences, les sélectionneurs peuvent aisément introgresser le génotype homozygote pour le  
30 transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" dans une lignée de maïs de génotype sauvage, et en particulier dans une lignée élite d'intérêt, par rétrocroisements successifs. Une lignée élite reconvertie homozygote pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygote pour un gène de restauration de la

fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" peut ainsi être obtenue. L'autofécondation de plants de maïs issus de ces semences permet ensuite de produire :

- des semences homozygotes pour le transgène AMS générant des plants de maïs mâles stériles qui, croisés avec des plants de maïs de génotype sauvage, et en particulier des plants appartenant à une lignée élite utilisée pour la reconversion, le cas échéant, produiront des semences hétérozygotes pour le transgène AMS. La fécondation de plants de maïs mâle stériles issus de ces semences par un plant de maïs de génotype sauvage, non-apparenté, produit alors des semences hybrides bénéficiant de l'effet de vigueur (hétérosis),
- des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes ou homozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", générant des plants de maïs non mâles stériles dont l'autofécondation produit notamment des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", assurant ainsi le renouvellement des plants de maïs mâles stériles d'intérêt.

Avantageusement, lorsque le transgène AMS est lié génétiquement à un gène codant une protéine d'intérêt, les semences hybrides homozygotes pour le transgène AMS s'avèrent particulièrement utiles pour générer des plants de maïs produisant ladite protéine d'intérêt.

Dans le cadre de la présente invention, une sélection des semences de maïs par le phénotype "petit grain" peut notamment être mise en œuvre par une méthode de tri dimensionnel ou densimétrique.

Un tri dimensionnel peut être réalisé de manière à séparer les grains en fonction de leur longueur, en utilisant par exemple un trieur à alvéoles, de leur largeur, avec par exemple un trieur à disques, ou de leur épaisseur, en utilisant par exemple un calibreur.

Le principe d'un tri densimétrique repose sur une séparation des grains selon leur densité et utilise notamment une colonne densimétrique ou une table densimétrique, ou un système de flottaison.

Plus particulièrement,

- le trieur à alvéoles est composé d'un cylindre horizontal tournant. La séparation se fait par la force centrifuge. Les plus petits grains entrent dans les alvéoles (qui tapissent l'intérieur du cylindre) et y sont maintenus par la force centrifuge.
- 5 - le trieur à disques se compose de disques épais disposés verticalement et creusés dans leur épaisseur d'alvéoles de dimension adaptée.
- les calibreurs les plus classiques sont les calibreurs par épaisseur composés de tamis plans ou cylindriques à perforations allongées obligeant la graine à se présenter selon sa plus faible épaisseur pour passer au travers. Le
- 10 calibreur à perforations rondes est du même principe mais les orifices ronds et de petits «redents» à l'intérieur du cylindre obligent la graine à se présenter verticalement pour traverser le tamis.
- la colonne densimétrique comprend un distributeur vibrant qui introduit le mélange de grains à trier à mi-hauteur d'une colonne creuse dans laquelle
- 15 monte un flux d'air homogène. Les particules lourdes descendent alors que les plus légères remontent. La séparation est ainsi effectuée.
- une table densimétrique permet de séparer des corps de mêmes dimensions mais de poids spécifique différent. Le poids spécifique correspond à une mesure de la masse d'une quantité de semences par rapport à son volume.
- 20 Le principe de l'appareil est un plan de travail (souvent constitué d'un réseau en fil métallique ou textile) traversé par un flux d'air uniforme qui fluidifie le mélange de semences et en provoque la stratification schématiquement en deux couches. Les produits lourds restent près de la table, les produits légers au-dessus. La séparation des deux couches est obtenue par réglage
- 25 de l'inclinaison du plan de travail (dans deux directions) et par un mouvement d'agitation de va-et-vient transversal. On pourra par exemple utiliser une table densimétrique telle que celle commercialisée par la société Cimbria Heid GmbH (Stockerau, Autriche).
- le système de flottaison est un système qui permet de séparer les grains en
- 30 fonction de leur densité et/ou masse en se basant sur leur capacité de flottaison sur un liquide, en particulier l'eau. Les grains les plus lourds (ayant la capacité de flottaison la plus faible) sont retrouvés au fond et les grains les plus légers (ayant la capacité de flottaison la plus élevée) sont retrouvés en surface du liquide, ce qui permet la séparation. Lorsque ce système est

utilisé, les semences doivent rester le moins longtemps possible au contact de l'eau afin de pas altérer leur capacité de germination. Une étape de séchage peut parfois être nécessaire.

5 La présente invention propose donc un procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", comprenant les étapes consistant à :

- 10 a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- 15 c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),
- d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

20 De façon préférentielle, au moins une étape de sélection du procédé comprend un tri densimétrique, notamment à l'aide d'une table ou d'une colonne densimétrique, ou d'un système de flottaison.

25 L'étape de sélection ainsi effectuée présente l'avantage de permettre un tri facilement réalisable et automatisable des grains en fonction de leur phénotype "petit grain" ou "normal".

Selon un mode particulier de réalisation, l'étape b) du procédé décrit ci-dessus peut être avantageusement remplacée par une étape de génotypage. La présente invention propose donc également un procédé de production de semences de maïs 30 homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", comprenant les étapes consistant à :

- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son

génomme un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

- b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a), et sélectionner les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b),
- d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

Selon un mode particulier de réalisation, ledit plant de maïs hétérozygote pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle contient en outre un gène codant une protéine d'intérêt, de préférence lié génétiquement au transgène AMS.

La mise en œuvre des procédés décrits ci-dessus permet de produire une semence de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". La présente invention vise donc une semence de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" susceptible d'être obtenue par l'un des procédés précédents. De manière préférentielle, le génotype AMS homozygote et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" peut être introgressé dans une lignée de maïs de génotype sauvage, et en particulier dans une lignée élite d'intérêt, par rétro-croisements successifs.

La mise en culture, puis l'auto-fécondation des plants de maïs obtenus à partir de semences ci-dessus (homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain") produit des semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS, ainsi que des semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes ou homozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS

sont facilement différenciables des autres semences ainsi produites car elles seules présentent des grains de phénotype normal.

La présente invention propose donc un procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"), comprenant les étapes consistant à :

a) auto-féconder des plants de maïs issus de semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptibles d'être obtenues par l'un des procédés précédemment décrits,

b) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

De façon préférentielle l'étape de sélection comprend un tri densimétrique, notamment à l'aide d'une table ou d'une colonne densimétrique, ou d'un système de flottaison. Cette étape permet avantageusement de trier les semences homozygotes pour le transgène AMS par leur phénotype de grain normal.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"), comprend les étapes consistant à :

a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),

d) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),

f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

Selon un mode particulier de réalisation, ledit plant de maïs hétérozygote pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle contient en outre un gène codant une protéine d'intérêt, de préférence lié génétiquement au transgène AMS.



L'étape e) de ce procédé pourra éventuellement être précédée d'une étape de rétrocroisements successifs avec un plant de maïs de génotype sauvage, et en particulier, un plant de maïs appartenant à une lignée élite, de manière à reconvertir ce plant de maïs de génotype sauvage avec le génotype homozygote pour le transgène AMS et hétérozygote pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les semences issues de cette étape de rétrocroisement sont alors utilisées pour la poursuite du procédé.

De façon préférentielle, au moins une étape de sélection, et en particulier l'étape f), comprend un tri densimétrique, notamment à l'aide d'une table ou d'une colonne densimétrique, ou d'un système de flottaison. Cette étape permet avantageusement de trier les semences homozygotes pour le transgène AMS par leur phénotype de grain normal.

Selon une autre variante, l'étape b) du procédé ci-dessus est remplacée par une étape de génotypage. La présente invention a donc également trait à un procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") comprenant les étapes consistant à :

- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a), et sélectionner les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b),
- d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),
- f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

Selon un mode particulier de réalisation, ledit plant de maïs hétérozygote pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle contient en outre un gène codant une protéine d'intérêt, de préférence lié génétiquement au transgène AMS.

L'étape e) de ce procédé pourra éventuellement être précédée d'une étape de rétrocroisements successifs avec un plant de maïs de génotype sauvage, et en particulier, un plant de maïs appartenant à une lignée élite, de manière à reconvertir ce plant de maïs de génotype sauvage avec le génotype homozygote pour le transgène AMS et hétérozygote pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les semences issues de cette étape de rétro-

---

croisement sont alors utilisées pour la poursuite du procédé.

De façon préférentielle, au moins une étape de sélection, et en particulier l'étape f), comprend un tri densimétrique, notamment à l'aide d'une table ou d'une colonne densimétrique, ou d'un système de flottaison. Cette étape permet avantagement de trier les semences homozygotes pour le transgène AMS par leur phénotype de grain normal.

La mise en culture de semences homozygotes pour le transgène AMS permet alors de générer des plants de maïs mâles stériles qui, croisés avec des plants de génotype sauvage, et en particulier avec des plants appartenant à une lignée élite, produisent des semences hétérozygotes pour le transgène AMS. La lignée élite utilisée pour ce croisement peut en particulier être celle utilisée pour l'étape de rétrocroisement éventuellement mise en œuvre dans les procédés précédents. Dans ce cas, les semences produites peuvent servir à produire des semences commerciales issues d'un hybride de maïs. Selon un autre mode de réalisation, la lignée élite de type sauvate peut être remplacée par un hybride de maïs pour obtenir des semences qui serviront à produire un hybride trois voies.

Selon un autre aspect de l'invention, le procédé de production de semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS peut être utilisé pour la production de protéines d'intérêt, notamment thérapeutique et/ou prophylactique. La protéine d'intérêt peut être produite dans toute la plante ou alors préférentiellement concentrée dans des organes spécifiques, comme les graines.

Le procédé selon l'invention a l'avantage de permettre de produire de telles protéines dans des conditions contrôlées et à grande échelle. Il est donc d'un grand intérêt pour le domaine pharmaceutique.

Pour se faire, un vecteur contenant le gène barnase, conférant la stérilité mâle, sous le contrôle du promoteur A9 et un gène d'intérêt thérapeutique et/ou

prophylactique peut être construit. Ce vecteur peut servir à l'obtention de plantes, contenant le gène conférant la stérilité mâle et le gène d'intérêt thérapeutique et/ou prophylactique, qui ensuite pourront être utilisées selon le système de production tel que décrit afin de produire des graines exprimant la protéine d'intérêt thérapeutique et/ou prophylactique.

En particulier, un tel vecteur peut servir à l'obtention d'un plant de maïs hétérozygote pour un transgène AMS (et donc pour le gène codant la protéine d'intérêt), lequel plant de maïs peut ensuite être croisé avec un plant de maïs restaurateur de fertilité de génotype (+/+ ; SSB/+).

Avantageusement, le gène d'intérêt thérapeutique et/ou prophylactique est lié génétiquement au transgène AMS.

Un tel système permet de produire uniquement la protéine d'intérêt thérapeutique et/ou prophylactique dans la graine par exemple ou dans un organe de la plante et ce quelque soit le stade de développement en fonction de la séquence régulatrice utilisée dans le gène codant ladite protéine d'intérêt, puisque la protéine conférant la stérilité mâle n'est pas produite dans les organes de la plante. Ce système permet ainsi d'éviter la dissémination du transgène d'intérêt thérapeutique et/ou prophylactique via le pollen, puisque les plantes sont complètement mâle stériles,

La présente invention concerne donc également un procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS comprenant le croisement d'un plant de maïs issu d'une semence homozygote pour un transgène AMS, susceptible d'être obtenue par l'un des procédés de production d'une semence homozygote pour le transgène AMS décrits précédemment, avec un plant de maïs de génotype sauvage.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS est caractérisé en ce que l'un des procédés de production d'une semence homozygote pour le transgène AMS décrits précédemment comprend en outre le croisement d'un plant de maïs issu de ladite semence homozygote pour un transgène AMS avec un plant de maïs de génotype sauvage.

La fécondation de plants de maïs mâle stériles issus de ces semences par un plant de maïs de génotype sauvage, non-apparenté, produit avantageusement des semences hybrides bénéficiant de l'effet de vigueur (hétérosis).

5 Selon un autre aspect, le système proposé par la présente invention permet avantageusement de maintenir des plants de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les procédés de production de semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS décrits ci-dessus comprennent en effet une  
10 sélection finale de semences notamment sur la base de leur phénotype de grain normal. Les semences de phénotype "petit grain" non sélectionnées par ces procédés peuvent être semées, puis les plants générés auto-fécondés, produisant ainsi notamment des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de  
15 phénotype "petit grain".

L'invention concerne donc un procédé de multiplication d'un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" comprenant les étapes consistant à :

- 20 a) autoféconder des plants de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptibles d'être obtenus à partir d'une semence d'un des procédés de production de semences homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié  
25 à un marqueur de phénotype "petit grain" précédemment décrits,
- b) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et de phénotype "petit grain",
- c) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de  
30 phénotype "petit grain" obtenues par autofécondation des plants de maïs obtenus à partir des semences obtenues selon l'étape b).

De façon préférentielle, l'étape b) du procédé ci-dessus comprend un tri densimétrique, notamment à l'aide d'une table ou d'une colonne densimétrique, ou d'un système de flottaison.

La présente invention a également pour objet des constructions nucléotidiques, appelées cassettes d'expression, comprenant une séquence nucléotidique promotrice liée de manière opérante à au moins un gène d'intérêt.

5 Ledit gène d'intérêt peut être également associé à d'autres éléments de régulation tels que des activateurs et des séquences de terminaison de transcription (terminateurs). D'autres éléments tels que les introns, enhancers, séquences de polyadénylation et dérivées peuvent également être présents dans la séquence nucléique d'intérêt, pour améliorer l'expression ou le fonctionnement du gène  
10 transformant. La cassette d'expression peut aussi contenir des séquences 5' non traduites dites "leader". De telles séquences peuvent améliorer la traduction.

De façon préférentielle, dans les procédés de production de semences précédemment décrits, le plant de maïs comprenant un transgène AMS conférant la  
15 stérilité mâle nucléaire artificielle est caractérisé en ce que le transgène AMS, de préférence le gène barnase (Hartley, 1988 ; Gene Bank n°X 12871), est compris dans une cassette d'expression, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse et d'un terminateur, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur.

20 De manière avantageuse, ladite cassette d'expression peut comprendre en outre un gène codant une protéine d'intérêt. Préférentiellement, ledit gène codant une protéine d'intérêt est lié génétiquement au transgène AMS, en particulier le gène barnase. De manière préférentielle encore, le gène codant une protéine d'intérêt n'est pas sous le contrôle dudit promoteur spécifique de la pollénogenèse.

25 Le promoteur spécifique de la pollénogenèse est notamment un promoteur permettant une expression spécifique dans l'anthere choisi parmi le groupe consistant en le promoteur A3 (WO 92 11379), le promoteur A6, le promoteur A9 (WO 92 11379), correspondant à la région 5' non codante du gène A9 d'*Arabidopsis thaliana*, et les promoteurs spécifiques du tapis de l'anthere tels que TA29, TA26,  
30 TA13 (WO 89 10396) ou Mac2 (WO 00 68 403).

Parmi les gènes codant un agent de sélection (également appelés gènes marqueurs de sélection), peuvent être notamment utilisés des gènes qui confèrent une résistance à un antibiotique (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), tel que l'hygromycine,

la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine ou à des herbicides (EP 242 246), tels que le glufosinate, le glyphosate ou le bromoxynil.

Préférentiellement, ledit gène codant un agent de sélection est choisi parmi le gène bar (White et al., 1990 ; Gene Bank n° X 17220) qui confère la résistance à l'herbicide Basta® (glufosinate) et le gène NPTII qui confère la résistance à la kanamycine (Bevan et al., 1983).

Le système d'excision pour éliminer le gène codant un agent de sélection peut être un système de transposition, tel que notamment le système Ac/Ds du maïs (WO 02 101061), ou un système de recombinaison, tel que notamment le système Cre/lox du bactériophage P1, le système FLP/FRT de la levure (Lyzrik et al., 1997), la recombinaison Gin du phage Mu, la recombinaison Pin de *E. coli* ou le système R/RS du plasmide pSR1. Un système de co-transformation (Komari et al., 1996) peut également être utilisé. Préférentiellement, le système utilisé sera le système Ac/Ds du maïs.

Selon un mode préféré, ledit gène est compris à l'intérieur de l'élément transposable Ds (également appelé élément dissociant ou séquence mobilisable d'un transposon).

Le transposon Ds utilisé est décrit dans la publication de Yoder et al., (1993). L'élément Ds est un élément Ac qui a subi d'importantes mutations ou délétions dans la séquence codant la transposase. Il ne peut s'exciser de son site d'insertion qu'en présence d'une source de transposase active Ac. Il est donc Ac dépendant. Un système préféré d'élimination de gène codant un agent de sélection peut comprendre deux composantes :

- une première plante ne possédant aucune transposase active, dans laquelle un construit comprenant la cassette d'expression du gène d'intérêt et celle du gène codant un agent de sélection encadré par les séquences mobilisables d'un transposon peut y être intégré.
- une deuxième plante contenant dans son génome un gène codant une transposase active endogène.

Le croisement de ces deux plantes conduit à l'obtention de régénérants, obtenus à partir de plantes F1 ou de plantes F2 sélectionnées pour la présence du gène d'intérêt sans gène codant un agent de sélection.

Préférentiellement selon l'invention, le promoteur associé au gène codant un agent de sélection est un promoteur constitutif, tel que le promoteur Actine-Intron-

actine, correspondant à la région en 5' non codante du gène de l'actine 1 du riz et son premier intron (Mc Elroy et al., 1991 ; Gene Bank n° S 44221). La présence du premier intron actine permet d'augmenter le niveau d'expression d'un gène lorsqu'il est fusionné en 3' d'un promoteur. Cette séquence promotrice permet par exemple  
5 l'expression constitutive du gène bar.

Parmi les terminateurs pouvant être utilisés avec le transgène AMS où le gène codant un agent de sélection, on peut notamment citer :

- le terminateur 3' Nos, terminateur de la nopaline synthase qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase provenant du  
10 plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982), et
- le terminateur 3' CaMV, correspondant à la région 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (Franck et al. 1980 ; Gene Bank n° V 00141).

15 Selon un autre aspect, la présente invention concerne une cassette d'expression comprenant un gène restaurateur de la fertilité lié génétiquement à au moins un gène codant un phénotype "petit grain", associés à des éléments permettant leur expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et  
20 un terminateur de transcription.

Parmi les promoteurs de transcription pouvant être utilisés en association avec le gène codant un phénotype "petit grain", on peut notamment citer :

- le promoteur HMWG (High Molecular Weight Glutenin) correspondant à la région 5' non codante du gène de la gluténine du blé (*Triticum aestivum*), une  
25 protéine de réserve de l'albumen. Ce promoteur, spécifique de la semence, est décrit dans la publication de Robert et al. (1989),
- le promoteur B32, décrit dans la publication de Di Fonzo N et al. (1988).

De façon préférentielle, ladite cassette d'expression comprenant un gène restaurateur de la fertilité lié génétiquement à au moins un gène codant un  
30 phénotype "petit grain", est caractérisée en ce que ledit gène restaurateur de la fertilité est le gène barstar (Hartley, 1998) placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse, notamment un promoteur spécifique de l'anthere tel que pA3, pA6, pA9, pTA29, ou du promoteur Mac2, et du terminateur 3'CaMV ou

3'Nos, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle du promoteur Actine-intron actine et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos.

5 Parmi les gènes codant un agent de sélection, peuvent être notamment utilisés des gènes qui confèrent une résistance à un antibiotique tel que l'hygromycine, la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine ou à des herbicides tels que le glufosinate, le glyphosate ou le bromoxynil. Préférentiellement, ledit gène codant un agent de sélection est choisi parmi le gène bar qui confère la résistance à l'herbicide Basta® et le gène NPTII qui confère la résistance à la kanamycine.

10 Préférentiellement, le gène codant un phénotype "petit grain" est choisi parmi les gènes shrunken 2 et brittle 2 en orientation antisens.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un vecteur, notamment un plasmide, caractérisé en ce qu'il contient au moins une cassette d'expression telle que décrite précédemment.

15 L'invention porte en outre sur un hôte cellulaire, notamment une bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par ledit vecteur. Un tel hôte cellulaire est utile pour transférer des cellules de maïs avec un vecteur selon l'invention.

20 L'invention concerne donc également une cellule de maïs transformée par au moins un vecteur tel que décrit précédemment. La transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert des vecteurs susmentionnés dans les protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol (PG) en présence de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) selon la méthode décrite dans l'article de Krens et al. (1982).

25 La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm et al. (1986).

30 La transformation des cellules végétales peut encore être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Finer et al. (1992).

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.



Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon les méthodes décrites dans les articles de Bevan (1984) et d'An et al. (1986), ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin et al, (1987).

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al., 1994).

Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

La présente invention a également pour objet de produire des plants de maïs transgéniques, parties de plante ou extraits de plante, caractérisés en ce qu'ils sont régénérés à partir de la cellule de plante transformée.

L'invention concerne notamment un plant de maïs restaurateur de la fertilité caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome un gène restaurateur de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" ou un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", obtenu à partir d'une semence de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

L'invention vise également un kit pour la mise en œuvre d'un procédé de multiplication d'un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et

hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" précédemment décrit, caractérisé en ce qu'il comprend des semences de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", et des oligonucléotides spécifiques du transgène AMS utiles en tant qu'amorces pour la détection par PCR des semences homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

Les exemples et figures suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée :

### **LEGENDE DES FIGURES**

La figure 1 représente le schéma de principe d'une succession d'étapes conduisant à la production d'une semence hybride selon l'invention.

La figure 2 représente le plasmide pRec 274 comprenant le gène barnase, conférant la stérilité mâle, et le gène bar, conférant la résistance à l'herbicide Basta®.

La figure 3 représente le plasmide donneur pBIOS 274 comprenant le gène de résistance à la spectinomycine ainsi que l'ADN-T porteur du gène barnase, sous le contrôle du promoteur A9, et du gène bar, sous le contrôle du promoteur Actine de riz.

La figure 4 représente le plasmide donneur pBIOS 424 comprenant le promoteur A9-barnase-terminateur 3' CaMV et le gène de résistance à la kanamycine NptII dans un élément dissociant Ds.

La figure 5 représente le plasmide p3222 comprenant la séquence antisens du gène brittle 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.

La figure 6 représente le plasmide p3223 comprenant la séquence antisens du gène shrunken 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.

La figure 7 représente le plasmide p4962 comprenant les séquences antisens des gènes shrunken 2 et brittle 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.

La figure 8 représente le plasmide pDM 302 comprenant la cassette d'expression du gène bar.

La figure 9 représente le plasmide donneur pBIOS 273 qui comporte une cassette d'expression comprenant le promoteur Actine de riz, le gène Bar, et le terminateur 3'Nos.

### EXEMPLES :

Une illustration non limitante d'un des procédés selon la présente invention est décrite dans la figure 1.

La construction des différents plasmides ainsi que leur ligation et la transformation des bactéries *Escherichia coli* XLI blue rendues préalablement compétentes, est réalisée grâce aux techniques usuelles d'ADN recombinant (Sambrook et al., 1989).

La construction des vecteurs d'expression et les techniques de transformation utilisées sont à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standard.

### EXEMPLE 1 : Construit AMS.

**1.a) Construction d'un plasmide (pRec 274) comprenant le gène barnase, conférant la stérilité mâle, lié au gène bar, conférant la résistance à l'herbicide Basta®.**

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* se présente sous la forme d'un plasmide superbinaire d'environ 50 kb (pRec 274).

Le vecteur superbinaire utilisé pour la transformation contient :

- une région ori : origine de réplication plasmidique Col EI, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans *Escherichia coli*. Cette origine de réplication n'est pas fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens*,
- une origine de réplication fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens* et dans *Escherichia coli*,
- la région cos du bactériophage lambda, pouvant présenter une utilité pour la manipulation du vecteur *in vitro*,
- les régions virB, virC et virG supplémentaires d'*Agrobacterium tumefaciens* qui augmentent l'efficacité de transformation,

- les gènes de résistance à la tétracycline (Tetra) et à la spectinomycine (Spect) qui s'expriment uniquement dans les bactéries,

- un ADN-T porteur des gènes barnase, conférant la stérilité mâle, et bar, conférant la résistance à l'herbicide Basta®, ces deux gènes étant  
5 opérationnellement liés à des éléments permettant leur transcription. Dans le présent exemple, le gène barnase est sous le contrôle du promoteur A9 et du terminateur 3' CaMV ; le gène bar étant sous le contrôle du promoteur actine-intron actine de riz et du terminateur 3' Nos.

Le gène bar de *Streptomyces hygroscopicus* code une Phosphinothricine Acyl  
10 Transferase (PAT) qui détoxifie la phosphinothricine (agent de sélection de l'herbicide Basta®) par acétylation (White et al., 1990). Il est généralement utilisé pour sélectionner des plantes transformées qui contiennent à la fois le gène d'intérêt et ce gène codant un agent de sélection, et qui sont donc résistantes à l'herbicide.

Le gène barnase, qui confère la stérilité mâle, code une Ribonucléase (RNase).  
15 Ce gène a été isolé à partir de *Bacillus amyloliquefasciens* et est décrit dans la publication de Hartley (1988).

Le plasmide superbinaire pRec 274 est représenté dans la Figure 2.

Ce vecteur superbinaire est obtenu par recombinaison homologue d'un  
20 plasmide accepteur pSB1 (EP 672.752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec un plasmide donneur pBIOS 274 (Figure 3), dérivé de pUC (Messing, 1983).

Le plasmide donneur possède le gène de résistance à la spectinomycine ainsi que l'ADN-T porteur du gène barnase, sous le contrôle du promoteur A9, et du gène  
25 bar, qui est aussi un gène de sélection, sous le contrôle du promoteur Actine de riz.

Les plasmides donneur et accepteur possèdent une région d'homologie suffisante pour permettre une recombinaison homologue et obtenir le vecteur dit superbinaire.

La technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* permet  
30 l'intégration du seul ADN-T constitué des bordures droite (RB) et gauche (LB) encadrant le gène d'intérêt (barnase) et le gène codant un agent de sélection.

**1.b) Construction d'un plasmide (pRec 424) comprenant le gène barnase conférant la stérilité mâle lié au gène NPT-II conférant la résistance à la kanamycine.**

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* se présente sous la forme d'un plasmide superbinaire d'environ 50 kb (pRec 424).

Le vecteur superbinaire utilisé pour la transformation contient :

- une région ori : origine de réplication plasmidique Col EI, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans *Escherichia coli*. Cette origine de réplication n'est pas fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens*,
- une origine de réplication fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens* et dans *Escherichia coli*,
- la région cos du bactériophage lambda, pouvant présenter une utilité pour la manipulation du vecteur *in vitro*,
- les régions virB, virC et virG supplémentaires d'*Agrobacterium tumefaciens* qui augmentent l'efficacité de transformation,
- les gènes de résistance à la tétracycline (Tetra) et à la spectinomycine (Spect) qui s'expriment uniquement dans les bactéries,
- un ADN-T porteur des gènes barnase, conférant la stérilité mâle, et NptII inséré dans un élément Ds, conférant la résistance à la kanamycine, ces deux gènes étant opérationnellement liés à des éléments permettant leur transcription. Dans le présent exemple, le gène barnase est sous le contrôle du promoteur A9 et du terminateur 3' CaMV ; le gène NptII inséré dans un élément Ds étant sous le contrôle du promoteur Actine et du terminateur et du terminateur 3' Nos.

25

Le gène NptII a été isolé à partir du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* (Berg et al. 1983). Ce gène code pour l'enzyme néomycine phosphotransférase de type II qui catalyse la O-phosphorylation d'antibiotiques aminoglycosides tels que néomycine, kanamycine, gentamycine et G418 (Davies et Smith, 1978). Ce gène confère la résistance à la kanamycine, qui est utilisée comme agent de sélection lors de la transformation génétique végétale. Il est décrit par Bevan et al. (Genbank n°U00004).

30

Le gène barnase, qui confère la stérilité mâle, code une Ribonucléase comme mentionné dans l'exemple 1.a ci-dessus.

Ce vecteur superbinaire est obtenu par recombinaison homologue d'un plasmide accepteur pSB1 (EP 672 752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec un plasmide donneur pBIOS 424 (Figure 4) dérivé de pUC  
5 (Messing, 1983).

Le plasmide donneur pBIOS 424 possède le gène de résistance à la spectinomycine ainsi que l'ADN-T porteur du gène barnase sous le contrôle du promoteur A9 et du gène NptII mis sous le contrôle du promoteur Actine inséré dans  
10 un élément Ds.

Le plasmide donneur pBIOS 424 (promoteur A9-barnase-terminateur 3' CaMV et le gène de résistance à la kanamycine NptII dans un élément dissociant Ds) a été généré de la manière suivante :

15 Le fragment contenant la cassette promoteur A9 - gène barnase - terminateur 3' CaMV a été isolé par :

- a) restriction avec *Xho*I,
- b) traitement à la T4 DNA Polymérase pour générer des bouts francs, et
- c) restriction avec *Xba*I à partir du plasmide pBIOS 274 (Figure 3).

20 Ce fragment (*Xho*I/blunt - *Xba*I) a ensuite été introduit dans le vecteur pBIOS 415 (décrit ci-dessous) ouvert à l'aide des enzymes de restriction *Eco*RV et *Xba*I.

Le fragment *Eco*RV-*Xba*I ainsi généré contient les séquences plasmidiques du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752) et la cassette élément Ds - promoteur Actine - intron actine - gène NPTII - terminateur Nos - élément Ds.

25 Le plasmide pBIOS 415 contient le gène de la GFP sous contrôle du promoteur CsVMV (WO 97/48819) et du terminateur Nos (fragment *Xba*I - *Xho*I) dans le vecteur accepteur pBIOS 340. Le vecteur pBIOS 340 est un vecteur contenant les séquences plasmidiques du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752) et la  
30 cassette élément Ds - promoteur Actine - intron actine - gène NPTII - terminateur Nos - élément Ds.

Les plasmides donneur et accepteur possèdent une région d'homologie suffisante pour permettre l'obtention du vecteur dit superbinaire par recombinaison homologue.

La technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* permet l'intégration du seul ADN-T constitué des bordures droite (RB) et gauche (LB) encadrant le gène d'intérêt (gène barnase) et le gène codant pour un agent de sélection.

## **EXEMPLE 2 : Construit Restaurateur-Marqueur phénotypique lié à la taille du grain.**

### **2.a) Construction d'un plasmide (p3222, figure 5) comprenant la séquence antisens du gène brittle 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.**

Le gène brittle 2 code une sous-unité de la ADP Glucose Pyrophosphorylase, enzyme intervenant dans la synthèse de l'amidon. En orientation antisens, il permet d'inhiber la synthèse de cette sous-unité ce qui produit un phénotype mutant dont la taille du grain est 50% inférieure à la taille normale.

Le gène barstar code un inhibiteur spécifique de la Barnase. Il a été isolé à partir de *Bacillus amyloliquefaciens* et est décrit dans Hartley (1998) (Genbank N° X15545).

Le plasmide p3222 est porteur de deux cassettes d'expression clonées individuellement. La première cassette comprenant le promoteur HMWG, le gène brittle 2 en orientation antisens et le terminateur Nos. La seconde cassette comprenant le promoteur A9, le gène Barstar et le terminateur CaMV.

Le gène brittle 2 a été synthétisé par PCR à partir d'ADNc d'albumen de maïs avec les oligonucléotides Bt5 (CCGGATCCATGTGACAGACAGTGTTA, SEQ ID n°1) contenant un site BamHI, et Bt3 (AAGCCCGGGACTTGTAATACTGTTTC, SEQ ID n°2) contenant un site SmaI.

Le fragment PCR de 600 pb ainsi obtenu a été digéré par SmaI et BamHI et cloné entre le promoteur HMWG et la région terminatrice nos du plasmide p3214

ouvert par SmaI et BamHI. Le plasmide p3215 ainsi obtenu contient la cassette d'expression promoteur HMWG-brittle 2 (orientation antisens)-nos.

Un fragment de 270 pb contenant le gène barstar a été amplifié par PCR à partir du plasmide pWP127 avec les oligonucléotides BPR5 (TATCGGATCCAAATCATAAGAAAGGAG, SEQ ID n°3) contenant un site BamHI, et BPR4 (GAAGATCTATATTGTTCATCCCATTG, SEQ ID n°4) contenant un site BglII. Le fragment PCR ainsi obtenu a été digéré avec BamHI et BglII et cloné entre le promoteur A9 et la région terminatrice CaMV du plasmide p1415 ouvert par BamHI. Le plasmide p3072 ainsi obtenu contient le gène barstar sous le contrôle du promoteur A9 et de la région terminatrice CaMV.

Le plasmide p3222 selon l'exemple 2.a) correspond à l'insertion de la cassette promoteur HMWG-brittle 2 (orientation antisens)-nos (fragment KpnI-SacI) de p3215 dans p3072 ouvert avec KpnI et SacI.

**2.b) Construction d'un plasmide (p3223, figure 6) comprenant la séquence antisens du gène shrunken 2 ainsi que le gène barstar restaurant la fertilité.**

Le gène shrunken 2 code l'autre sous-unité de la ADP Glucose Pyrophosphorylase, enzyme intervenant dans la synthèse de l'amidon. En orientation antisens, il permet d'inhiber la synthèse de cette sous-unité ce qui produit un phénotype mutant dont la taille du grain est 40% inférieure à la taille normale.

Le plasmide p3223 est porteur de deux cassettes d'expression clonées individuellement. La première cassette comprenant le promoteur HMWG, le gène shrunken 2 en orientation antisens et le terminateur Nos. La seconde cassette comprenant le promoteur A9, le gène Barstar et le terminateur CaMV.

Le gène shrunken 2 a été synthétisé par PCR à partir d'ADNc d'albumen de maïs avec les oligonucléotides New Sh5 (GCACCCGGGAGGAGATATGCAGTTTG, SEQ ID n°5) contenant un site SmaI, et Sh3 (GACTGCAGCACAAATGGTCAAG, SEQ ID n°6) contenant un site PstI.

Le fragment PCR de 1800 pb ainsi obtenu a été digéré par SmaI et PstI et cloné entre le promoteur HMWG et la région terminatrice nos du plasmide p3214 ouvert par SmaI et PstI. Le plasmide p3217 ainsi obtenu contient la cassette d'expression promoteur HMWG-shrunken 2 (orientation antisens)-nos.



Un fragment de 270 pb contenant le gène barstar a été amplifié par PCR à partir du plasmide pWP127 avec les oligonucléotides BPR5 (TATCGGATCCAAATCATAAGAAAGGAG, SEQ ID n°7) contenant un site BamHI, et BPR4 (GAAGATCTATATTGTTTCATCCCATTTG, SEQ ID n°8) contenant un site BglII.

5 Le fragment PCR ainsi obtenu a été digéré avec BamHI et BglII et cloné entre le promoteur A9 et la région terminatrice CaMV du plasmide p1415 ouvert par BamHI. Le plasmide p3072 ainsi obtenu possède le gène barstar sous le contrôle du promoteur A9 et de la région terminatrice CaMV.

10 Le plasmide p3223 selon l'exemple 2.b) correspond à l'insertion de la cassette promoteur HMWG-shrunken 2 (orientation antisens)-nos (fragment KpnI-SacI) de p3217 dans p3072 ouvert avec KpnI et SacI.

15 **2.c) Construction d'un plasmide (pRec 4962) comprenant les séquences antisens des gènes shrunken 2 et brittle 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.**

20 Le plasmide p4962 (figure 7) est porteur de deux cassettes d'expression clonées individuellement. La première cassette comprenant le promoteur HMWG, le gène shrunken 2 en orientation antisens, le gène brittle 2 en orientation antisens et le terminateur Nos. La seconde cassette comprenant le promoteur Mac2.1, le gène Barstar et le terminateur CaMV. Ce plasmide a été construit par des techniques de biologie moléculaire classiques connues de l'homme de l'art.

Le plasmide p4962 se présente sous la forme d'un vecteur donneur dérivé du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752) d'environ 11,7 kb comprenant :

25 - une région ori : origine de répllication plasmidique Col E1, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans la bactérie,

- un gène de résistance à la spectinomycine s'exprimant uniquement dans les bactéries,

30 - un T-DNA comprenant le gène de restauration de la fertilité mâle (gène barstar) et les séquences antisens des gènes shrunken 2 et brittle 2 conférant un phénotype 'petit grain'.

Dans le présent exemple, le gène barstar est sous le contrôle du promoteur Mac2.1 et du terminateur 3'CaMV, les gènes shrunken 2 et brittle 2 en orientation antisens étant sous le contrôle du promoteur HMWG et du terminateur 3'Nos.

Le vecteur superbinaire pRec 4962 est obtenu par recombinaison homologue d'un plasmide accepteur pSB1 (Japan Tobacco, EP 672 752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec le plasmide donneur p4962.

5

### **EXEMPLE 3 : Plasmide de sélection**

3.a) *Construction d'un plasmide (pDM 302, figure 8) comprenant le gène bar conférant la résistance à l'herbicide Basta® utilisé comme plasmide de sélection en co-transformation avec le plasmide restaurateur.*

10

Comme indiqué dans l'exemple 1, le gène bar permet de sélectionner les plantes transformées qui sont résistantes à l'herbicide Basta®.

Le plasmide pDM302 (Cao et al., 1992) est porteur de la cassette d'expression comprenant le promoteur Actine-Intron-actine, le gène Bar et le terminateur Nos.

15

Ce plasmide pDM302 a été obtenu de la manière suivante :

La région codante du gène bar de *Streptomyces hygroscopicus* codant pour l'activité PAT (Phosphinothricine Acétyl Transférase) a été excisée du plasmide pIJ4104 (White et al., 1990) par l'enzyme de restriction SmaI (fragment de 600 pb) et clonée dans le vecteur d'expression pCOR113 (McElroy et al., 1991) derrière le fragment 5' (promoteur et premier intron) du gène Actine 1 (Act-1) de riz. Ceci a généré le plasmide pDM301 de 4.9 kb contenant la cassette d'expression Act1-bar. La cassette d'expression Act1-bar de pDM301 a été excisée en tant que fragment de restriction XhoI-XbaI de 2.0 kb et clonée entre les sites Sall et XbaI en amont de la séquence terminatrice du gène nos codant la nopaline synthase (plasmide pNOS72). Le plasmide pDM302 de 4.7 kb ainsi obtenu contient la cassette d'expression Act1-bar-nos.

20

25

30

3.b) *Construction d'un plasmide pRec 273 comprenant le gène bar conférant la résistance à l'herbicide Basta® utilisé comme plasmide de sélection en co-transformation avec le plasmide restaurateur.*

Le plasmide pBIOS 273 (Figure 9) est porteur d'une cassette d'expression comprenant le promoteur Actine de riz, le gène Bar, et le terminateur 3'Nos. Ce

plasmide a été construit par des techniques de biologie moléculaire classiques connues de l'homme de l'art.

Le plasmide pBIOS 273 se présente sous la forme d'un vecteur donneur dérivé du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752), d'environ 8,6 kb  
5 comprenant :

- une origine ori : origine de réplication plasmidique Col E1, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans la bactérie,

- un gène de résistance à la spectinomycine s'exprimant uniquement dans les bactéries,

- un T-DNA comprenant le gène Bar conférant la résistance à l'herbicide Basta® sous le contrôle du promoteur Actine de riz et du terminateur 3' Nos.

Le plasmide pBIOS 273 a été généré en deux étapes :

- clonage du fragment BspDI/XhoI (promoteur Actine – gène Bar - terminateur Nos) du vecteur pDM 302 (Cao et al. 1992) dans les sites SmaI et BspDI du vecteur pSB12 (Japan Tobacco EP 672 752). Le vecteur résultant de ce clonage est appelé pBIOS 272.

- délétion du site XhoI en position 3363 du vecteur pBIOS 272 par digestion partielle avec XhoI et action de l'ADN Polymerase I, large (Klenow) fragment. Le vecteur obtenu, possédant un site unique XhoI, est nommé pBIOS 273.

Le vecteur superbinaire pRec 273 est obtenu par recombinaison homologue d'un plasmide accepteur pSB1 (Japan Tobacco, EP 672 752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec le plasmide donneur pBIOS 273.

#### **EXEMPLE 4 : Production d'une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS.**

***4.a) Production d'une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS (AMS/+) par transformation du maïs avec le plasmide décrit selon l'exemple 1a (pRec 274).***

Une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote exprimant les gènes barnase (conférant la stérilité mâle) et bar (résistance au glufosinate) respectivement sous contrôle des promoteurs A9 (Paul et al., 1992) et actine-intron (Mc Elroy et al., 1991) est obtenue par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* selon la méthode  
5 décrite par Ishida et al. (1996).

Dans l'exemple suivant, la lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) a été produite par la méthode de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. D'autres techniques de transformation connues de l'homme de l'art peuvent être utilisées.

10

#### Obtention et préparation du matériel végétal :

Des épis de maïs sont décontaminés durant 15 à 20 minutes dans du Domestos 20% sous agitation et ensuite rincés à l'eau stérile avant de prélever les embryons immatures qui sont placés dans du milieu LSinf. La taille des embryons  
15 immatures optimale est de 1 à 1,2 mm, ce qui correspond à 10 +/- 2 jours après fécondation. Les embryons sont ensuite agités au vortex, le milieu LSinf est éliminé, et un rinçage dans du milieu LSinf est effectué avant d'agiter au vortex à nouveau.

#### Préparation des bactéries :

Des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA 4404) contenant le plasmide super binaire pRec 274 (comme décrit selon exemple 1a) sont mises en culture dans du milieu YP supplémenté avec un agent sélectif approprié à la souche.  
20 2 à 3 jours après, les bactéries sont mises en suspension dans du milieu LSinf + acétosyringone 100 µM. La concentration de l'inoculum est considérée à 1.10<sup>9</sup>  
25 bactéries/ml.

#### Inoculation et coculture :

Après avoir éliminé le milieu LSinf, les embryons sont mis en contact avec les Agrobactéries. Après avoir agité au vortex, 50 µl de Pluronic F68 à 1% sont rajoutés  
30 et une incubation de 5 minutes à température ambiante est effectuée. L'inoculum est éliminé et les embryons sont récupérés et placés sur milieu 1,5LSAs, scutellum vers le haut. Après avoir scellé la boîte, une incubation de 5 jours à 25°C à l'obscurité est effectuée.

### Sélection de cals transformés :

A l'issue de la coculture, les embryons sont transférés sur milieu LSD5 et placés par nombre de 25 par boîte scellée avec de l'Urgopore. Une incubation de 2 semaines à 25 °C à l'obscurité (1<sup>ère</sup> sélection) est effectuée. Une 2<sup>ème</sup> sélection  
5 consiste à transférer les embryons sur milieu LSD10 en coupant les germinations. Une incubation de 3 semaines est effectuée dans les mêmes conditions qu'en 1<sup>ère</sup> sélection. Une 3<sup>ème</sup> sélection est effectuée en excisant les -jolis- cals de type I de façon à obtenir des fragments de 1-2 mm. Une mise en culture sur milieu LSD10, puis une incubation de 3 semaines dans les mêmes conditions qu'en première et  
10 seconde sélection sont effectuées.

### Régénération de plantules transformées :

Les cals de type I ayant proliféré sont placés sur milieu LSZ2 et les boîtes sont scellées avec du scellofrais® et placées en chambre de culture à 27°C pendant 2  
15 semaines. Les cals de type I ayant proliféré sont à nouveau repiqués, séparés et placés sur milieu RM+G4C100. Les boîtes sont scellées avec du scellofrais® et placées en chambre de culture à 27°C. Les plantules régénérées sont repiquées sur milieu T1G4 et placées sous illumination continue, à 27°C pendant une à deux semaines. Les plantules ayant atteint un développement suffisant sont transférées  
20 au phytotron.

Afin d'identifier les plantules résistantes à l'herbicide Basta®, et donc ayant intégré le transgène, une étape de sélection est effectuée avec une solution Basta F1 (AgrEvo France). L'application de cette solution se fait par "Leaf Painting" (c'est à dire en badigeonnant les feuilles) sur les plantes de maïs au stade 4-5 feuilles. La  
25 concentration en glufosinate d'ammonium de la solution de traitement est de 0,75 grammes par litre.

Les plantes résistantes présentent une zone non nécrosée 5 jours après l'application de l'herbicide. Les plantes sensibles présentent une nécrose au niveau de la zone traitée ; on observe alors la mort des tissus chlorophylliens.

30 Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

**4.b) Production d'une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS (AMS/+) par transformation du maïs avec le plasmide décrit selon l'exemple 1b (pRec 424).**

5 Une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote exprimant le gène barnase conférant la stérilité mâle, sous le contrôle du promoteur A9 (Paul et al., 1992), est obtenue par transformation avec *A. tumefaciens* selon la méthode décrite par Ishida et al. (1996). La technique de transformation avec *Agrobacterium tumefaciens*, non limitante, utilisée dans cet exemple est identique à celle utilisée dans l'exemple 4.a.

10 La transformation avec la cassette d'expression A9-Barnase-3'CaMV-Ds::NPTII comportant le gène barnase sous le contrôle du promoteur A9 et du terminateur 3'CaMV (selon l'exemple 1b) sur un vecteur utilisable en transformation via *Agrobacterium* et comportant le marqueur de sélection « Kanamycine » à l'intérieur de l'élément transposable Ds a l'avantage d'éliminer le gène marqueur qui ne se  
15 retrouvera pas dans la lignée de maïs transformée.

Dans le présent exemple l'identification des plantules ayant intégrées le transgène se fait de la manière suivante :

Régénération de plantules transformées :

20 Les cals de type I ayant proliféré sont placés sur milieu LSZ2 et les boîtes sont scellées avec du scellofrais® et placées en chambre de culture à 27°C pendant 2 semaines. Les cals de type I ayant proliféré sont à nouveau repiqués, séparés et placés sur milieu RM+G4C100. Les boîtes sont scellées avec du scellofrais® et placées en chambre de culture à 27°C. Les plantules régénérées sont repiquées sur  
25 milieu T1G4 et placées sous illumination continue, à 27°C pendant une à deux semaines. Les plantules ayant atteint un développement suffisant sont transférées au phytotron.

30 Afin d'identifier les plantules résistantes à la kanamycine et donc ayant intégré le transgène, une étape de sélection (par le test goutte cornet) est effectuée avec une solution de kanamycine à une concentration de 500 mg/l additionnée de 1% de Tween. 2 à 3 gouttes de cette solution sont appliquées sur les plantes de maïs au stade 4-5 feuilles.

L'analyse des plantes s'effectue 5 jours après l'application de la kanamycine. Les plantes sensibles présentent l'apparition de zones blanchâtres (mort des tissus chlorophylliens). Les plantes résistantes ne présentent pas l'apparition de zones blanchâtres 5 jours après l'application de la kanamycine.

5 Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

Une fois que les transformants (comprenant la cassette d'expression A9-Barnase-3'CaMV-Ds::NPTII) ont été isolés par action de l'agent de sélection et/ou  
10 par analyses moléculaires, le gène codant l'agent de sélection est éliminé. Les transformants sélectionnés sont donc croisés avec une source de transposase active Ac.

La fécondation est réalisée manuellement par une technique connue de  
15 l'homme de l'art par le dépôt du pollen de la source de transposase Ac sur les soies des transformants, de préférence dans le sens plante mâle possédant la transposase dans la plante femelle contenant l'élément Ds::NptII.

Les grains F1 sont mis à germer pour obtenir des plantules. Les plantules sont évaluées pour leur résistance à la kanamycine (les plantes résistantes sont  
20 conservées) et un test PCR est effectué pour détecter les excisions somatiques (une excision somatique ne touche généralement pas les gamètes et conduit à la formation de graines et d'individus chimériques dont la plupart des cellules possèdent encore le gène codant l'agent de sélection). Les amorces utilisées pour ce test PCR qui permet de rechercher les excisions somatiques sur les plantes F1  
25 résistantes à l'agent de sélection sont les suivantes :

Nom	Taille (pb)	Séquence
Barn5	21	5'-GGTTTCGCTCATGTGTTGAGC-3' (SEQ ID N°15)
EM11	25	5'-CATTGCGGACGTTTTTAATGTACTG-3' (SEQ ID N°16)

Le couple d'amorces Barn5/EM11 permet de visualiser l'excision (d'autres amorces adéquates peuvent également être utilisées). L'amplification est différente en fonction de s'il y a eu ou pas excision.

Les plantes F1 où il y a eu excision somatique sont donc sélectionnées, puis croisées avec une plante de génotype sauvage (WT). Les plantes F2 sont criblées afin d'identifier les plantes avec le gène d'intérêt sans gène codant l'agent de sélection (une excision germinale touche les gamètes et conduit à la formation de graines et d'individus constitués de cellules qui ne possèdent plus le gène codant l'agent de sélection).

#### **4.c) Caractérisation moléculaire des transformants**

La méthodologie Southern (1975) est utilisée pour démontrer l'insertion du transgène dans le génome de la plante et pour évaluer le nombre de copies et caractériser le profil d'intégration.

L'ADN génomique des plantes (8µg) est extrait à partir des feuilles des plantes suivant un protocole d'extraction au CTAB (Cétyltriméthylammonium bromide), selon le protocole de Keller J (DNAP 6701 San Pablo Ave Oakland CA 94608 USA) modifié par Bancroft I. (Department of Molecular Genetics, Cambridge Laboratory, John Innes Center for Plant Science Research, Colney lane, Norwich, England). L'ADN obtenu a été digéré par différentes enzymes de restriction, séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et transféré sur membrane de nylon hybond N+ puis hybridé avec des sondes radioactives.

La sonde Bar pour les analyses moléculaires est préparée de la manière qui suit. Le plasmide pDM302 (décrit dans l'exemple 3a) de la présente invention) est digéré avec l'enzyme Sma I. Le fragment d'intérêt de 0.6 Kb est récupéré après migration du produit de digestion sur gel d'électrophorèse et purification avec le kit Gene Clean (Bio 101, Ozyme). Après marquage au P32 de 30 ng de fragment, celui-ci est utilisé comme sonde pour hybrider les différents blots.

L'événement de transformation mâle stérile (STB27b) est un transformant obtenu par transformation via *Agrobacterium tumefaciens* selon l'exemple 4a) décrit



ci-dessus, et qui présente une insertion monocopie du T-DNA tel que décrit selon l'exemple 1a. Les résultats d'hybridation de l'ADN digéré par différentes enzymes de restriction (NcoI, SpeI, EcoR V, HindIII et Ecor I), puis hybridé avec la sonde Bar montrent qu'un seul fragment est mis en évidence quelle que soit l'enzyme utilisée. La taille du fragment révélé par la digestion Hind III est de 1.7 kb. Ce même type de caractérisation moléculaire est effectué pour les transformants obtenus par transformation via *Agrobacterium tumefaciens* selon l'exemple 4b).

**EXEMPLE 5 : Production d'une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+).**

**5.a) Production d'une lignée de maïs restauratrice de la fertilité (SSB/+) hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité par co-transformation du maïs avec les plasmides des exemples 2a , 2b (plasmides restaurateurs) et 3a (plasmide pDM 302 de sélection).**

On utilise préférentiellement une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules. Cependant, d'autres techniques de transformation connues de l'homme de l'art peuvent être utilisées.

#### Production d'embryons immatures :

Elle consiste à l'autofécondation d'une plante de la lignée Hill ou au croisement "frère-soeur" (sib) de 2 plantes de la lignée Hill. La fécondation est réalisée à date unique après avoir isolé les organes reproducteurs.

#### Prélèvement de l'épi :

Le prélèvement des épis est réalisé lorsque les embryons immatures ont atteint une taille de 1,5 mm à 2 mm, c'est à dire 10 à 11 jours après la fécondation dans nos conditions de culture (température de 25°C le jour et 18°C la nuit, photopériode 16/8).

### Désinfection :

Les épis récoltés sont débarrassés de leurs spathes et de leurs soies puis sont désinfectés au Domestos® 20% (v/v) pendant 15 minutes sous agitation. Les épis seront rincés trois fois à l'eau stérile.

### Extraction des embryons :

La partie supérieure du grain est coupée de façon à découvrir l'albumen, puis une légère pression sur le grain permet de dégager l'albumen. L'embryon immature qui se trouve encore dans le grain (contre le péricarpe) est extrait puis déposé sur le milieu de callogénèse N6P6 en l'orientant côté plat sur la gélose. Trente six embryons par boîte sont mis en culture pendant 4 jours en chambre de culture à 26 °C et à l'obscurité. Il s'agit de la période d'initiation.

### Transformation génétique :

#### - Préparation des embryons :

Après la période d'initiation, les embryons sont déposés 4 heures avant le tir sur le milieu de choc osmotique N6P6 0.4 M et sont disposés par 36 en un petit carré de 2 cm<sup>2</sup> au centre de la boîte. Les boîtes sont scellées au scello-frais et incubées en chambre de culture (obscurité à 26°C ).

Les plasmides portant les gènes à introduire (plasmides décrits dans les exemples 2a, 2b et 3a) sont purifiés sur colonne Qiagen® en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungstène (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (1987). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. Finer (1992).

Les boîtes d'embryons ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais® puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24h après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif dont la nature et la concentration peuvent varier selon le gène utilisé. Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en des composés actifs de certains herbicides (Basta®, Round up®) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine...). De manière préférentielle, le gène de résistance à l'herbicide Basta® sera utilisé.

- Maturation et régénération des cals de type II :

Lorsqu'on a suffisamment de matériel pour un événement, on le transfère sur le milieu de maturation MM+G2 qui favorise le développement d'embryons somatiques.

5 On étale le cal à la surface du milieu MM+G2. Les boîtes sont mises en chambre de culture à l'obscurité et à 26°C. Après 15 jours (minimum) sur le milieu MM+G2, des embryons somatiques apparaissent. Ces derniers sont repiqués sur milieu de régénération RM+G2 (20 à 25 par boîte) et cultivé à 28°C et à la lumière (16h/24h). On considère que 4 boîtes en régénération sont suffisantes pour obtenir des

10 régénérants.

Après environ 15 jours sur le milieu RM+G2, les embryons se sont développés en plantules qui sont ensuite repiquées en tubes sur le milieu d'enracinement T1+G2. On considère que 5 plantules par événement sont nécessaires pour réussir l'acclimatation au phytotron et les envois. Ces plantules sont mises en chambre de

15 culture à la lumière.

On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent de sélection (glufosinate d'ammonium), habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection.

20 L'efficacité de transformation est de 10 %.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules. Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

25

- Acclimatation :

L'acclimatation des plantules est réalisée quand ces dernières se sont suffisamment développées sur T1+G2 c'est à dire lorsque les racines atteignent le fond du tube et lorsque l'axe collinaire est suffisamment rigide et développé. Les

30 plantules sont acclimatées au phytotron en godets avec du terreau légèrement enrichi. Les godets sont disposés sur tablette située à 1,5 mètres des lampes. Pour maximiser l'obtention de descendance, l'acclimatation de 2 plantules au phytotron est nécessaire. En moyenne, deux semaines sont nécessaires pour le sevrage des plantules.

Les plantes ainsi régénérées et acclimatées sont ensuite cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

5 Ce mode de réalisation consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) par co-transformation d'une plante de maïs avec les plasmides des exemples 2a, 2b et 3a est le premier mode de réalisation.

10 Un deuxième mode de réalisation consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) consiste à co-transformer une plante de maïs avec les plasmides des exemples 2a et 3a selon le même protocole que décrit ci-dessus.

15 Un troisième mode de réalisation consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) consiste à co-transformer une plante de maïs avec les plasmides des exemples 2b et 3a selon le même protocole que décrit ci-dessus.

20 **5.b) Production d'une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) par co-transformation du maïs avec les plasmides des exemples 2c (plasmide pRec 4962 restaurateur) et 3b (plasmide pRec 273 de sélection).**

25 La production de la lignée de maïs restauratrice de la fertilité selon le présent exemple 5b est réalisée par co-transformation d'une plante de maïs avec les plasmides décrits selon les exemples 2c et 3b selon la technique de co-transformation par *Agrobacterium tumefaciens* connue de l'homme de l'art.

Le gène bar (gène codant l'agent de sélection) est éliminé lors de la co-transformation. 10% des transformants obtenus contiennent les 2 cassettes d'expression contenues dans les plasmides des exemples 2c et 3b. Il y aura ségrégation dans la descendance.

30 Ce mode de réalisation (4<sup>ème</sup> mode) consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) est le mode préférentiel selon la présente invention. Cependant, d'autres techniques de transformation connues de l'homme de l'art peuvent être utilisées.

### 5.c) Caractérisation moléculaire des transformants.

Le transformant SSB-001a obtenu selon l'exemple 5a) a été caractérisé par la même méthodologie que celle décrite selon l'exemple 4c de la présente invention.

L'analyse moléculaire a été réalisée sur le transformant SSB-001a résistant à l'herbicide Basta® (n° de plante 12928), sur une plante sœur résistante à l'herbicide Basta® (n° de plante 12929), et sur 2 plantes sensibles à l'herbicide (13008 et 13061). Ces 4 plantes sont issues de l'épi du transformant primaire SSB-001a. L'ADN génomique (14µg) des plantes a été digéré par les enzymes de restriction Eco RV et Hind III. Trois sondes ont été utilisées pour l'analyse : promoteur A9 (pA9), promoteur HMWG (pHMWG) et Bar.

Les résultats des hybridations moléculaires avec la sonde Bar indiquent que les profils moléculaires sont identiques pour les deux plantes résistantes à l'herbicide Basta. Les hybridations avec les sondes pA9 et pHMWG révèlent un grand nombre de bandes, reflétant une intégration en plusieurs copies des plasmides p3222 et p3223. L'hybridation avec la sonde Bar montre un profil simple, une bande majeure est révélée pour les 2 enzymes Eco RV et Hind III. La taille du fragment révélé par la digestion Hind III est de 8 kb. Les bandes d'intensité très faible correspondent aux signaux très intenses révélés précédemment avec les sondes pA9 et pHMWG.

**EXEMPLE 6 :** Croisement de la lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) avec la lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) : obtention des plantes F1.

La lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) résistante à l'herbicide Basta® obtenue selon l'exemple 4a est croisée avec la lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+), plante résistante à l'herbicide Basta®, obtenue selon l'exemple 5 afin d'obtenir les plantes F1. Le même type de croisement peut être réalisé entre la lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) obtenue selon l'exemple 4b, et la lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+), obtenue selon l'exemple 5. La fécondation est réalisée manuellement par

une technique connue de l'homme de l'art. La plante mâle stérile est menée à floraison, le pollen de la plante (SSB/+) est déposé sur les soies de la lignée mâle stérile.

5 A l'issue de ce croisement, des analyses génétiques sont effectuées sur les plantes F1. Les analyses génétiques consistent en un comptage, en rapport à la présence des différents marqueurs, parmi la descendance.

Toutes les fréquences théoriques mentionnées sont vraies si et seulement s'il n'y a pas de liaison entre le transgène AMS et le gène restaurateur de la fertilité.

#### 10 Bilan génétique de la F1 :

	AMS	+
SSB	SSB/+ ; AMS/+	SSB/+ ; +/+
+	AMS/+ ; +/+	+/+ ; +/+

#### Bilan phénotypique de la F1 :

Phénotype Grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	50 %	50 %	50 %
Déprimés	50 %	100 %	0 %

15

La F1 est donc composée pour moitié de grains normaux, l'autre moitié étant des grains déprimés (phénotype 'petit grain' causé par les gènes shrunken2 et brittle2 en orientation antisens).

20 Pour chaque F1, nous avons évalué la ségrégation pour la résistance au glufosinate afin de détecter les lots de grains déprimés.

Les grains déprimés sont sélectionnés par un tri visuel sur l'épi de maïs. Ces grains sont tous résistants à l'herbicide Basta®.

Les grains déprimés, qui ont le génotype (AMS/+ ; SSB/+) ou (+/+ ; SSB/+), sont sélectionnés, puis semés et mis à germés.

25

#### **EXEMPLE 7 : Autofécondation des plantes F1 pour production de la F2.**

Les plantes F1 résistantes à l'herbicide Basta® issues de grains déprimés selon l'exemple 6 sont autofécondées afin d'obtenir les plantes F2.

Les plantes F1 issues de grains déprimés étant constituées à la fois de plantes de génotype (SSB/+ ; +/+) et de plantes de génotype (SSB/+ ; AMS/+), deux cas d'autofécondations se présentent alors :

#### 7.a) Autofécondations des plantes de génotype (SSB/+ ; +/+).

Les plantes F1 de génotype (SSB/+ ; +/+) obtenues selon l'exemple 6 sont autofécondées. A l'issue de cette autofécondation, les analyses génétiques sont effectuées sur les plantes F2 :

Bilan génétique de la F2 :

	SSB	+
SSB	SSB/SSB ; +/+	SSB/+ ; +/+
+	SSB/+ ; +/+	+/+ ; +/+

Bilan phénotypique de la F2 :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	25 %	0 %	100 %
Déprimés	75 %	100 %	0 %

Cette étape d'autofécondations des plantes de génotype (SSB/+ ; +/+) peut être avantageusement éliminée par une étape de génotypage en effectuant une PCR spécifique du transgène AMS sur les plantes F1 issues de grains déprimés selon l'exemple 6. Les grains déprimés sont mis à germer, les plants de maïs autofécondés, et un tri moléculaire est effectué par PCR. Seules les plantes positives pour la détection du transgène AMS par PCR sont conservées.

Les amorces spécifiques du gène d'intérêt AMS (pA9-Barnase-3'CaMV) permettant son amplification par PCR sont les suivantes :

Nom	Orientation	Séquence
A9A (Pro A9)	Direct	TAGACATTGTAGGTTGGTTTTG (SEQ ID n°9)
Barn 1 (barnase)	Direct	GCACAGGTTATCAACACGTTTGAC (SEQ ID n°10)
Barn 4 (barnase)	Direct	ATCCGGCCATTTCTGAAGAGAA (SEQ ID n°11)
A9B (Pro A9)	Reverse	TCTAGTTACTTCATAAGTTTTG (SEQ ID n°12)
Barn 6 (barnase)	Reverse	TTGCGGGTTTGTGTTTCCATATTG (SEQ ID n°13)
CaMVol1 (3'CaMV)	Reverse	ATTGATAAGGGGTTATTAGGGG (SEQ ID n°14)

- 5 La taille du fragment amplifié à l'aide des couples d'amorces A9A / A9B, Barn1 / Barn 6 ou Barn4 / CaMVol1 est 799 pb, 880 pb ou 979 pb, respectivement.

### 7.b) Autofécondations des plantes de génotype (AMS/+ ;SSB/+).

- 10 Les plantes F1 de génotype (AMS/+ ; SSB/+) obtenues selon l'exemple 6 sont autofécondées afin d'obtenir la descendance F2. A l'issue de cette autofécondation, les analyses génétiques sont effectuées sur la descendance F2 :

Bilan génétique de la F2 :

15

	AMS ; +	+ ; SSB	AMS ; SSB	+ ; +
AMS ; +	AMS/AMS ; +/+	AMS/+ ; SSB/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/+ ; +/+
+ ; SSB	AMS/+ ; SSB/+	SSB/SSB ; +/+	AMS/+ ; SSB/SSB	SSB/+ ; +/+
AMS ; SSB	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/+ ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/+ ; SSB/+
+ ; +	AMS/+ ; +/+	SSB/+ ; +/+	AMS/+ ; SSB/+	+/+ ; +/+

Bilan phénotypique de la F2 :



Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	25 %	75 %	25 %
Déprimés	75 %	100 %	0 %

L'analyse génétique de la descendance F2 sur les grains normaux (25 %) pour l'expression du gène barnase avec la résistance à l'herbicide Basta®, permet de déterminer les plantes hybrides F1 qui présentaient le génotype (SSB/+ ; AMS/+). Au niveau des plantes F2 issues des grains déprimés, 1/6 ont le génotype (AMS/AMS ; SSB/+). Sur les plantes F2 qui ont des grains normaux, 1/4 ont le génotype (AMS/AMS ; +/+).

### 7.c) Résultats.

14 épis F2 ont été produits. Pour chacun de ces épis, un tri par rapport au phénotype du grain (déprimé ou pas) a été effectué. 14 lots de graines transgéniques (de A à N) ont donc été analysés. Ces 14 lots de graines (lot A à lot N) ont été divisés en deux en fonction de leur phénotype normal ou déprimé. Le code utilisé pour les 28 ensembles de graines ainsi préparés est par exemple pour le lot A : A 01 = grains normaux, A02 = grains « déprimés ».

### EXEMPLE 8 : Semis des grains déprimés de la descendance F2 et génotypage des plantes (AMS/AMS ; SSB/+).

Un semis dirigé des grains F2 obtenus ci-dessus, en fonction du phénotype, déprimé ou normal du grain, puis la détection par génotypage des plantes (AMS/AMS ; SSB/+) ont été effectués.

**8.a) Semis de la descendance F2.**

Un semis dirigé des 14 familles a été effectué et au stade 3-4 feuilles un test Basta en spray 0,5% a été réalisé. Les résultats de ce test sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Code	Phénotype grains	Nombre de grains semés	Nombre de levées		Nombre de résistantes		Nombre de sensibles	
			/ grains semés	%	/ grains semés	%	/ grains semés	%
A 01	normaux	30	30	100	27	90	3	10
A 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
B 01	normaux	30	28	93,3	0	0	24	85,7
B 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
C 01	normaux	30	30	100	19	63,3	11	36,7
C 02	déprimés	60	59	98,3	56	94,9	3	5,1
D 01	normaux	30	30	100	20	66,7	10	33,3
D 02	déprimés	60	60	100	57	95	3	5
E 01	normaux	30	30	100	19	63,3	11	36,7
E 02	déprimés	50	48	96	48	100	0	0
F 01	normaux	30	30	100	2	6,7	28	93,3
F 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
G 01	normaux	30	29	96,7	21	72,4	8	27,6
G 02	déprimés	60	59	98,3	59	100	0	0
H 01	normaux	15	15	100	7	46,7	8	53,3
H 02	déprimés	30	29	96,7	29	100	0	0
I 01	normaux	30	30	100	0	0	24	80
I 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
J 01	normaux	30	30	100	0	0	27	90
J 02	déprimés	60	59	98,3	55	93,2	4	6,8
K 01	normaux	30	30	100	21	70	9	30
K 02	déprimés	60	60	100	58	96,7	5	8,3
L 01	normaux	30	30	100	0	0	29	96,7
L 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
M 01	normaux	30	30	100	22	73,3	7	23,3
M 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
N 01	normaux	30	28	93,3	20	71,4	7	25
N 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0

Les résultats du test ont permis d'éliminer les familles B, F, I, J, et L qui résultaient de l'autofécondation de plantes F1 avec le génotype (SSB/+ ; +/-).

Les familles A, C, D, E, G, H, K, M, et N ont été conservées. Ces épis résultaient de l'autofécondation de plantes F1 avec le génotype (SSB/+ ; AMS/+). Les bilans génétique et phénotypique de l'autofécondation de ces plantes ont été détaillés dans l'exemple 7b. Dans ces familles sélectionnées, toutes les plantes résistantes à l'herbicide Basta® issues de grains normaux (lots finissant par 01) et jusqu'à 40 plantes résistantes à l'herbicide Basta® issues de grains déprimés ont été gardées pour culture.

**8.b) Identification par génotypage et Southern Blot des plantes de génotype (AMS/AMS ; SSB/+).**

Une analyse moléculaire est effectuée pour identifier les plantes homozygotes pour le transgène issu de STB-27b (AMS/AMS) et hétérozygotes pour le transgène issu de SSB001a (SSB/+).

L'ADN génomique de la descendance a été extrait à partir de 50 mg de feuilles suivant le protocole et utilisation du kit d'extraction Qiagen Dneasy 96 plant kit (Qiagen SA, 91974 Courtaboeuf cedex, France). La méthodologie Southern est utilisée pour identifier les profils moléculaires.

Pour chaque individu, on visualise la présence des deux gènes Bar : celui venant de STB27b et celui venant de SSB001a. Pour cela, les ADN ont été digérés avec l'enzyme Hind III puis hybridés avec la sonde Bar. D'après les analyses moléculaires réalisées sur les transformants parents, nous savons qu'un fragment d'une taille de 8 kb correspond à la copie du gène Bar issu du transformant SSB001a et un fragment d'une taille de 1.7 Kb correspond à la copie du gène Bar issu du transformant STB27b. Pour une plante donnée, l'intensité des signaux d'hybridation est également évaluée, ceci afin d'identifier la zygote (hétérozygotie ou homozygotie) des plantes pour le gène Bar considéré (SSB001a ou STB27b).

Cette analyse nous permet donc d'identifier le génotype des plantes issues du croisement SSB x STB. D'après la sélection préalable des graines dont sont issues ces plantes, 6 génotypes sont attendus et présentés dans le tableau 1.

Tableau 1:

Génotype			% théorique
Nombre de copies Bar de SSB-001a	Nombre de copies Bar de STB-27b		
2	0	A	8,3
2	1	B	16,7
2	2	C	8,3
1	0	D	16,7
1	1	E	33,3
1	2	F	16,7
Total			100

Le génotype recherché dans cette étude est l'homozygotie pour l'ADN-T de STB-27b (« 2 copies » du gène Bar) et l'hétérozygotie pour le gène Bar SSB-001a (« 1 copie » du gène Bar).

Des Southern blots ont été réalisés avec l'ADN de 8 plantes filles provenant d'un épi et ce, sur les 9 épis sélectionnés. 58 plantes ont été génotypées suivant le protocole décrit précédemment. Tous les génotypes attendus sont représentés parmi les 9 plantes analysées (2 épis différents).

Au total, 10 plantes présentent le génotype d'intérêt à savoir : homozygotie pour le T-DNA de STB-27b (« 2 copies » du gène Bar) et hétérozygotie pour le gène Bar SSB-001a (« 1 copie » du gène Bar). Les fréquences observées sont très proches des fréquences théoriques attendues quel que soit le génotype considéré (Tableau 2).

15 Tableau 2 :

Génotype		Nombre Plantes	% observé	% théorique
Nombre copies Bar de SSB-001a	Nombre de copies Bar de STB-27b			
2	0	3	5,2	8,3
2	1	9	15,5	16,7
2	2	3	5,2	8,3
1	0	11	19	16,7
1	1	22	37,9	33,3
1	2	10	17,2	16,7
Total		58	100	100

**EXEMPLE 9 :** Obtention de semences de pré-base (AMS/AMS ; +/+), de semences de base (AMS/+ ; +/+), et de semences hybrides.

De nombreux croisements peuvent être envisagés pour produire des semences de pré-base, des semences de base, et des semences hybrides. Les croisements décrits ci-dessous ne sont pas limitatifs :

**9.a) Autofécondation des plants (AMS/AMS ; SSB/+) afin d'obtenir des semences de pré-base.**

L'intérêt de ce croisement est de multiplier la lignée avec le génotype (AMS/AMS ; SSB/+) ainsi que de produire des semences avec le génotype (AMS/AMS ; +/+) ou semences de pré-base.

En effet, les autofécondations produisent de la semence homozygote pour le transgène conférant la stérilité mâle (au niveau de la F3, tous les grains normaux seront de génotype (AMS/AMS ; +/+)). A l'issue de cette autofécondation, les analyses génétiques sont effectuées :

Bilan génétique :

	AMS ; SSB	AMS ; +	AMS ; SSB	AMS ; +
AMS ; SSB	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+
AMS ; +	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+
AMS ; SSB	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+
AMS ; +	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+

Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	25 %	100 %	0 %
Déprimés	75 %	100 %	0 %

La totalité des grains normaux ont le génotype (AMS/AMS ; +/+). Il s'agit des semences de pré-base. 75 % des grains déprimés ont le génotype (AMS/AMS ; SSB/+). Les plants issus de ces grains déprimés peuvent être autofécondés afin de multiplier (maintenir) les plants de génotype (AMS/AMS ; SSB/+). Le plant de génotype (AMS/AMS ; SSB/+) est également appelé plant mainteneur de la stérilité.

**9.b) Croisement des plants de génotype (AMS/AMS ; SSB/+) avec la lignée élite de génotype sauvage (WT) afin d'obtenir des semences de génotype (AMS/+ ; +/+).**

Les plantes issues de grains déprimés sont croisées avec une lignée élite WT. A l'issue de ce croisement, les analyses génétiques sont effectuées :

Bilan génétique :

	AMS ; SSB	AMS ; +	AMS ; SSB	AMS ; +
+ ; +	AMS/+ ; SSB/+	AMS/+ ; +/+	AMS/+ ; SSB/+	AMS/+ ; +/+

Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	50 %	100 %	0 %
Déprimés	50 %	100 %	0 %

Deux cas de figures se présentent :

- dans 2/3 des cas les plantes F2 avaient le génotype (AMS/+ ; +/+). Sur ces épis F3 seuls sont obtenus des grains normaux avec une ségrégation à l'herbicide Basta® de 50/50. Ces épis ne nous intéressent pas.

- dans 1/3 des cas les plantes F2, avaient le génotype (AMS/AMS ; +/+). Sur ces épis F3 seuls sont obtenus des grains normaux avec un génotype (AMS/+ ; +/+) 100% résistants à l'herbicide Basta®. Ce sont ces épis qui nous intéressent. Les grains normaux de génotype (AMS/+ ; +/+) constituent les semences de base.

20 graines de chaque épi F3 sont semées et les épis d'intérêt sont identifiés en fonction de la résistance à l'herbicide Basta®.

**9.c) Croisement des plants de génotype (AMS/AMS ; +/+) avec la lignée élite de génotype sauvage (WT) afin d'obtenir des semences de génotype (AMS/+ ; +/+).**

Les plantes issues des grains de génotype (AMS/AMS ; +/+) sont croisées avec une lignée élite. De préférence, cette lignée élite est identique à celle utilisée dans l'étape de rétrocroisements successifs afin d'introgesser le génotype (AMS/AMS ; SSB/+).

L'intérêt de ce croisement est de produire de la semence de base de génotype (AMS/+ ; +/+).

Bilan génétique :

	AMS	AMS
+	AMS/+ ; +/+	AMS/+ ; +/+
+	AMS/+ ; +/+	AMS/+ ; +/+

Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	100%	100%	0%

Tous les grains (qui sont normaux) ont le génotype (AMS/+ ; +/+) et par conséquent donneront des plantes mâles stériles.

5 **9.d) Croisement des plants de génotype (AMS/+ ; +/+) avec la lignée élite mâle (WT) afin d'obtenir des semences hybrides.**

Les plantes issues des semences de génotype (AMS/+ ; +/+) sont croisées avec une lignée élite mâle. De préférence, la lignée élite utilisée dans ce croisement est différente de celle utilisée dans le croisement décrit dans l'exemple 9.c).

10 L'intérêt de ce croisement est de produire de la semence hybride.

Bilan génétique :

15

	AMS	+
+	AMS/+ ; +/+	+/+ ; +/+
+	AMS/+ ; +/+	+/+ ; +/+

Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	100%	50%	50%

20

Tous les grains sont normaux. La moitié d'entre eux donneront des plantes mâles stériles, l'autre moitié donneront des plantes mâles fertiles assurant ainsi la pollinisation et par conséquent la production de maïs « consommation » ou maïs « grain ».

25



### **EXEMPLE 10 : Tri par table densimétrique des grains déprimés.**

La table densimétrique utilisée permet de diviser en six fractions, des grains de taille et de qualité superficielle équivalentes, mais qui diffèrent entre eux par leur poids spécifique.

Un tri densimétrique est effectué sur un lot de graines d'épis F3, issues de l'autofécondation de plantes de génotype (+/+ ; SSB/+). Théoriquement, ces épis ont une proportion de 75% de grains déprimés et 25% de grains normaux. 33 épis ont été égrainés de manière à obtenir environ 500 grammes de semences. 6 fractions de grains ont été constituées par tri densimétrique.

Le tableau ci-dessous est une synthèse des résultats obtenus (triage par rapport au phénotype du grain et analyses génétiques sur l'expression du gène bar conférant la résistance au glufosinate).

	Triage phénotype grain			Résultats analyses génétiques						
	nombre total de grains	nombre de grains normaux	nombre de grains déprimés	nombre grains semés	nombre levées		nombre résistantes		nombre sensibles	
					/ grains semés	%	/ levées	%	/ levées	%
Fraction 1	50	0	50	40	36	90	36	100	0	0
Fraction 2	69	0	69	60	49	81,7	49	100	0	0
Fraction 3	445	27	418	160	156	97,5	149	96	7	4
Fraction 4	97	8	89	80	80	100	72	90	8	10
Fraction 5	540	103	437	160	154	96,3	120	78	34	22
Fraction 6	779	756	23	160	155	96,9	6	4	149	96

#### **Triage par rapport au phénotype du grain (normal ou déprimé) :**

Les fractions 1 et 2 ne comportent que des grains déprimés.

Dans les fractions 3, 4 et 5 nous avons essentiellement des grains déprimés mais nous trouvons également quelques grains normaux (soit 6.1, 8.2 et 19.1% respectivement pour les fractions 3, 4 et 5).

Quant à la fraction 6 nous avons quasiment que des grains normaux (97%).

Les fractions 1 à 5 correspondent donc aux grains déprimés et la fraction 6 aux grains normaux.

On retrouve également une petite quantité de grains non triés. Cette petite quantité correspond à la fois à des grains normaux et à des grains déprimés. Cependant, visuellement, les grains déprimés sont plus importants en nombre par rapport aux grains normaux.

5

Résultats d'analyses génétiques (sur l'expression du gène bar conférant la résistance à l'herbicide Basta®) :

Les résultats d'analyses génétiques confortent ceux du triage fait sur le phénotype du grain pour chacune des fractions.

10

Nous avons donc dans la fraction 6 une petite partie de grains déprimés (environ 3 à 4%). Cette dernière est complètement éliminée par un deuxième passage sur la table densimétrique.

15

Les fractions de 1 à 5 correspondent aux grains déprimés et la fraction 6 aux grains normaux.

20

**Exemple 11 : Evaluation des différentes étapes de la production de semences hybrides de maïs à partir de ce nouveau procédé.**

Trois types d'expérimentation ont été testés pour la production de semences :

- Production de semences de pré-base
- Production de semences de base
- Production de semences hybrides

25

Production de semences de pré-base :

30

La production de semences de pré-base (génotype (AMS/AMS ; +/+)) a été assurée par la culture de plants de génotype (AMS/AMS ; SSB/+). Ces plants ont bien été observés mâles fertiles.

Les plants de génotype (AMS/AMS ; SSB/+) sont autofécondés. Environ 25% des grains obtenus dans la descendance correspondent à des semence de pré-base.

Production de semences de base :

La production de semences de base (génotype (AMS/+ ; +/+)) a été assurée par la culture de plants de génotype (AMS/AMS ; +/+). Ces plants ont bien été observés mâles stériles et ne présentent aucun effet délétère sur l'aspect végétatif de la plante attestant que l'utilisation d'un transgène AMS à l'état homozygote est compatible avec le système de production de semences hybrides de maïs tel que décrit dans la présente invention.

Les plants de génotype (AMS/AMS ; +/+) ont été croisés avec un plant de génotype sauvage. 100% des grains obtenus dans la descendance correspondent à des semences de base.

Production de semences hybrides :

La production de semences hybrides a été obtenue par croisement entre des plants mâle stériles de génotype (AMS/+ ; +/+) issus des semences de base avec une lignée élite sauvage. Tous les plants de génotype (AMS/+ ; +/+) ont bien montré une stérilité mâle complète (stérilité à 100 %).

## **EXEMPLE 12 : Production de semences hybrides.**

En production de semences, deux types de croisements sont préférentiellement effectués. Ces deux croisements permettent de produire de la semence hybride.

**12.a) Croisement des plants de génotype (AMS/AMS ; SSB/+) avec des plants de génotype (AMS/AMS ; +/+).**

Bilan génétique :

	AMS ; SSB	AMS ; +	AMS ; SSB	AMS ; +
AMS ; +	AMS/AMS ; SSB /+	AMS/AMS ; +/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+

AMS ; +	AMS/AMS ; SSB /+	AMS/AMS ; +/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+
---------	---------------------	------------------	--------------------	------------------

Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	50%	100%	0%
Déprimés	50%	100%	0%

- 5 50% des grains obtenus sont normaux et ont tous le génotype (AMS/AMS ; +/+). Ces grains peuvent être séparés par un tri densimétrique, préférentiellement à l'aide d'une table densimétrique.

- 10 **12.b) Croisement des plants de génotype (AMS/AMS ; SSB/+) avec une lignée élite de génotype sauvage (WT).**

Bilan génétique :

	AMS ; SSB	AMS ; +	AMS ; SSB	AMS ; +
+ ; +	AMS/+ ; SSB/+	AMS/+ ; +/+	AMS/+ ; SSB/+	AMS/+ ; +/+

- 15 Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
<b>Normaux</b>	50%	100%	0%
Déprimés	50%	100%	0%

- 20 Tous les grains normaux ont le génotype (AMS/+ ; +/+). Ces grains peuvent être séparés par un tri densimétrique, préférentiellement à l'aide d'une table densimétrique.

Ce croisement permet un gain de temps dans l'obtention des semences hybrides (6 à 12 mois en moins) par rapport au croisement décrit dans l'exemple 12.a). En revanche, il nécessite une surface de production de la lignée mainteneuse (de génotype AMS/AMS ; SSB/+) plus importante en taille pour un nombre

5 d'hectares de semence (hybride) équivalent.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- An et al. (1986) *Plant Physiol.* 81, 86-91.
- Anderson, O.D., Green, F.C., Yip, R.E., Halford, N.G., Shewry, P.R. and  
5 Malpica-Romero, J.-M. (1989) *Nucl. Acid. Res.* 17, 461.
- Bevan et al. (1984) *Nucleic Acid Research*, 11, 369-385.
- Cao J., Duan, X., McElroy, D. and Wu, R. (1992) *Plant. Cell. Rep.* 11, 586-  
591.
- Cheng W.H., Taliercio E.W. and Chourey P.S. (1996). The Miniature1 Seed  
10 Locus of Maize Encodes a Cell Wall Invertase Required for Normal Development of  
Endosperm and Maternal Cells in the Pedicel. *Plant Cell.*, 8(6):971-983.
- Chourey P.S., Nelson O.E. (1976). The enzymatic deficiency conditioned by  
the shrunken-1 mutations in maize. *Biochem Genet*, 14(11-12):1041-55.
- Depicker et al., (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 561-573.
- 15 - Di Fonzo N, et al. (1988) *Mol Gen Genet* 212(3), 481-7.
- Finer J. (1992) *Plant Cell Report* 11 : 323-328.
- Franck et al. (1980) *Cell*, 21, 285-294.
- Fromm et al. (1986) *Nature*, 319, 791-793.
- Hartley, R.W (1988) *J. Mol. Biol.* 202, 913-915.
- 20 - Herrera-Estrella et al (1983), *EMBO J.* 2, 987-995.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) *Nat.*  
*Biotechnol.* 14(6):745-50.
- Jouanin et al. (1987) *Plant Sci.*, 53, 53-63.
- Klein (1987) *Nature* 327 :70-73.
- 25 - Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N., Kumashiro T. (1996). Vectors arrying  
two separate T-dans for co-transformation of higher plants mediated by  
*Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection  
markers. *Plant Journal*, 10, 165-174.
- Krens et al. (1982) *Nature*, 296, 72-74.
- 30 - Lyzrik L. et Hodges T. (1997). FLP mediated recombination of FRT sites in the  
maize genome. *Nucleic Acids Research*, 44, 123-132.
- McElroy D., Blowers, A.D., Jeñes, B. and Wu, R. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 231,  
150-160.

- Messing J. et al. (1983) *Methods in Enzymology*, 101, 20-78.
- Paul, W., et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 19 : 611-622.
- Robert et al. (1989) *Plant Cell*, 1 : 569-578.

5     - Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,  
Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,  
New York.

- Southern E.M. (1975) *J. Mol Biol.* 98 : 503-517.

- Watson et al. (1994) Ed. De Boeck Université, pp 273-292.

10     - White, J., Chang S-YP., Bibb, MJ. and Bibb, MJ. (1990) *Nucl. Acid. Res.* 18,  
1062.

- Yoder et al. (1993) *Bio/Technology*, 12, 263-292.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",  
comprenant les étapes consistant à :
- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
  - b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
  - c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),
  - d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".
2. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",  
comprenant les étapes consistant à :
- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
  - b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a),
  - c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b),
  - d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".



3. Semence de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 1 ou 2.

5

4. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"), comprenant les étapes consistant à :

10

a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

15

b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),

20

d) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),

f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

25

5. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") comprenant les étapes consistant à :

30

a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a),

c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b),

d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),

f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

6. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène AMS, comprenant les étapes consistant à :

a) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon la revendication 3,

b) sélectionner des semences homozygotes pour un transgène AMS.

7. Procédé selon l'une des revendications 1, 2 et 4 à 6, caractérisé en ce que au moins une étape de sélection comprend un tri densimétrique.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le tri densimétrique s'effectue à l'aide d'une table densimétrique.

9. Procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS comprenant le croisement d'un plant de maïs issu d'une semence homozygote pour un transgène AMS, susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 4 à 8, avec un plant de maïs de génotype sauvage.

10. Procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS, caractérisé en ce que le procédé selon l'une des revendications 4 à 8 comprend en outre le croisement d'un plant de maïs issu de ladite semence homozygote pour un transgène AMS avec un plant de maïs de génotype sauvage.

11. Procédé selon l'une des revendications 1, 2 et 4 à 10, dans lequel le transgène AMS conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle est le gène barnase, lequel est compris dans une cassette d'expression, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse, notamment un promoteur spécifique de l'anthere tel que pA3, pA6, pA9, pTA29, ou du promoteur Mac2, et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle du promoteur Actine-intron actine et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la cassette d'expression comprenant le gène barnase comprend en outre un gène codant une protéine d'intérêt thérapeutique et/ou prophylactique lié génétiquement au gène barnase.
13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur spécifique de la pollénogenèse pA9.
14. Procédé selon l'une des revendications 11, 12 ou 13, caractérisé en ce que ledit gène codant un agent de sélection est choisi parmi le gène bar qui confère la résistance à l'herbicide Basta® et le gène NptII qui confère la résistance à la kanamycine, ledit gène étant compris à l'intérieur de l'élément transposable Ds.
15. Cassette d'expression comprenant un gène restaurateur de la fertilité lié génétiquement à au moins un gène codant un phénotype 'petit grain', associés à des éléments permettant leur expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.
16. Cassette d'expression selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit gène restaurateur de la fertilité est le gène barstar placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse, notamment un promoteur spécifique de l'anthere tel que pA3, pA6, pA9, pTA29, ou du promoteur Mac2, et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle du promoteur Actine-intron actine et du terminateur 3'CamV ou 3'Nos
17. Cassette d'expression selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que ledit gène codant un phénotype 'petit grain' est choisi parmi les gènes shrunken 2 et brittle 2 en orientation antisens.
18. Cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que le promoteur associé au gène codant un phénotype 'petit grain' est choisi parmi les promoteurs HMWG et B32.

19. Cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisée en ce que ledit terminateur est choisi parmi le terminateur 3'Nos et le terminateur 3'CaMV.

20. Vecteur, notamment plasmide, caractérisé en ce qu'il contient au moins une cassette d'expression telle que décrite dans l'une des revendications 11 à 19.

21. Hôte cellulaire, notamment bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur selon la revendication 20.

22. Cellule de maïs transformée par au moins un vecteur selon la revendication 20.

23. Plant de maïs restaurateur de la fertilité caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome un gène restaurateur de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

24. Plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", obtenu à partir d'une semence selon la revendication 3.

25. Procédé de multiplication d'un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", comprenant les étapes consistant à :

a) autoféconder des plants de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 ou 2,

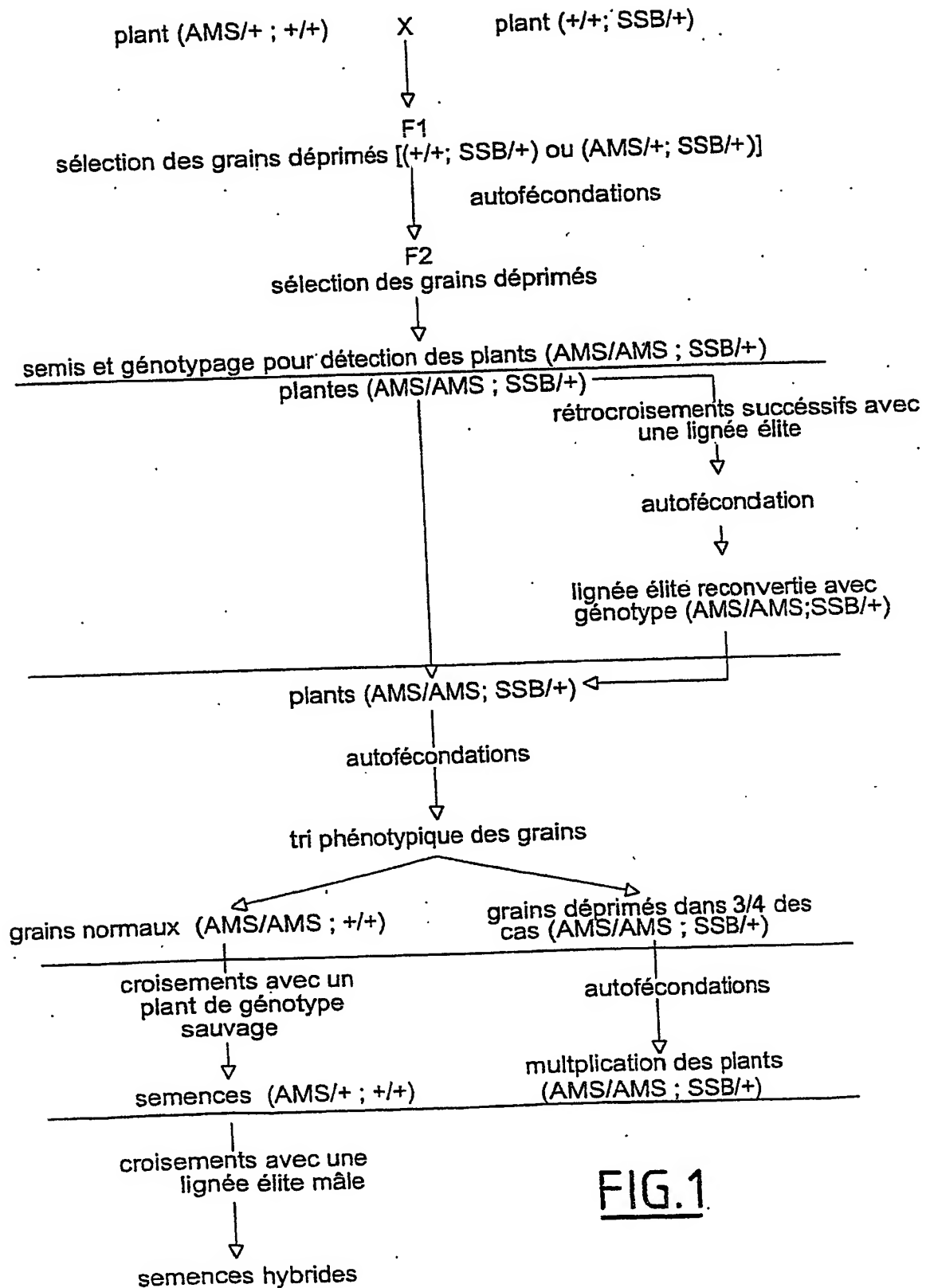
b) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et de phénotype "petit grain",

c) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" obtenues par autofécondation des plants de maïs obtenus à partir des semences obtenues selon l'étape b).

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'étape b) comprend un tri densimétrique.

27. Kit pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 25 ou 26,  
5 caractérisé en ce qu'il comprend des semences de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", et des oligonucléotides spécifiques du transgène AMS utiles en tant qu'amorces pour la détection par PCR des semences  
10 homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

1/9

FIG.1.

2/9

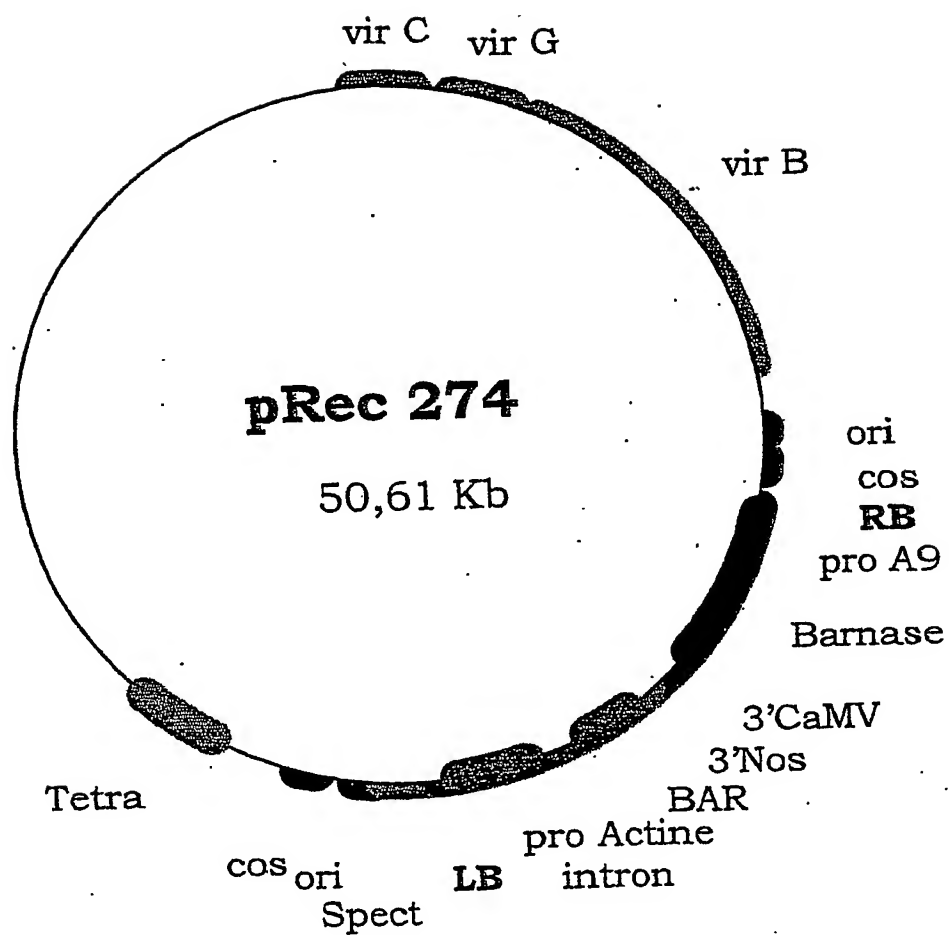
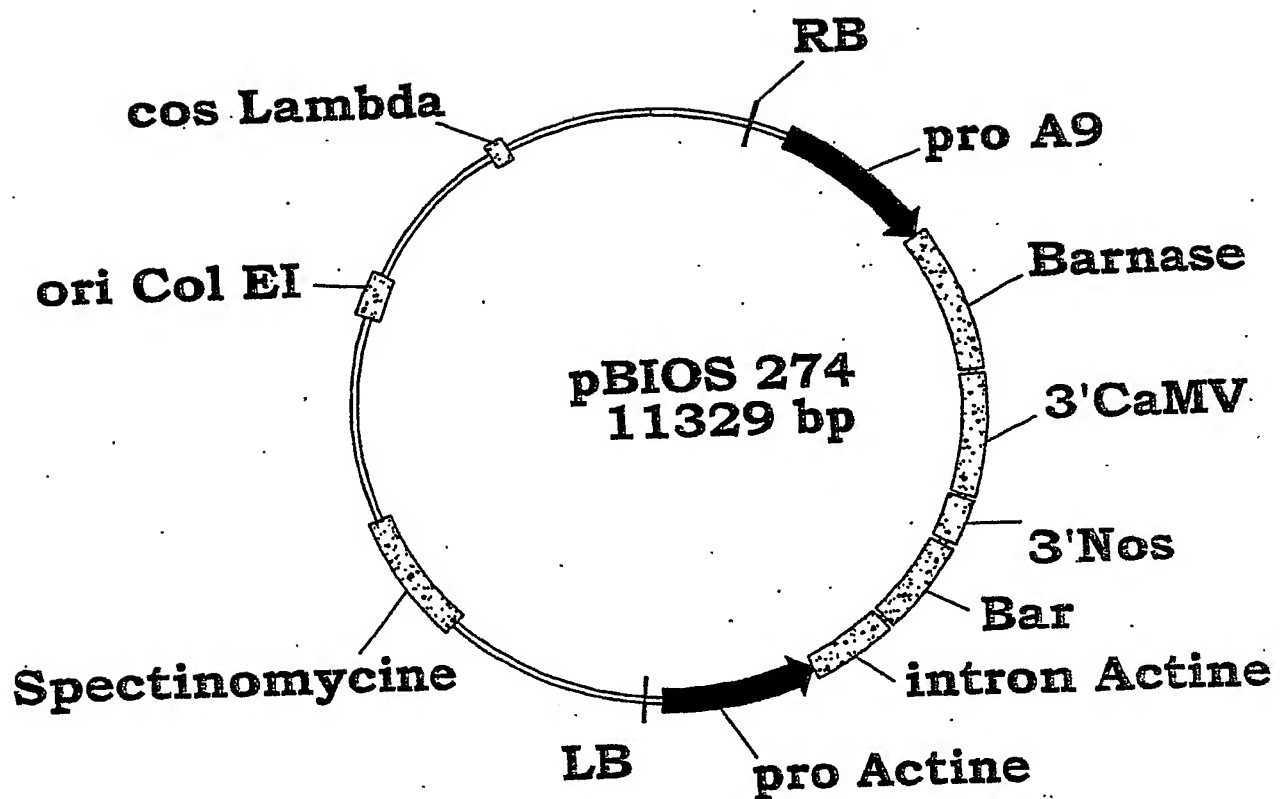


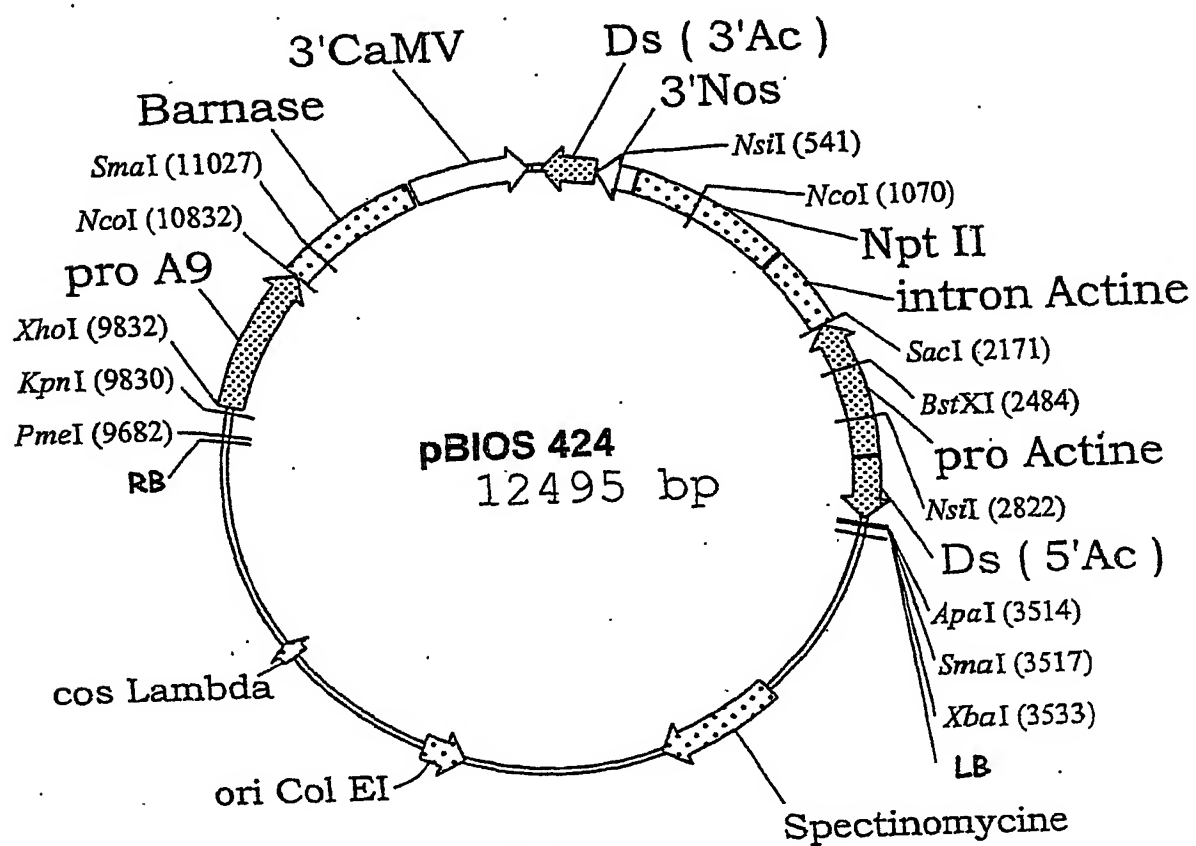
FIG.2

3/9

FIG.3



4/9

**FIG.4**

5/9

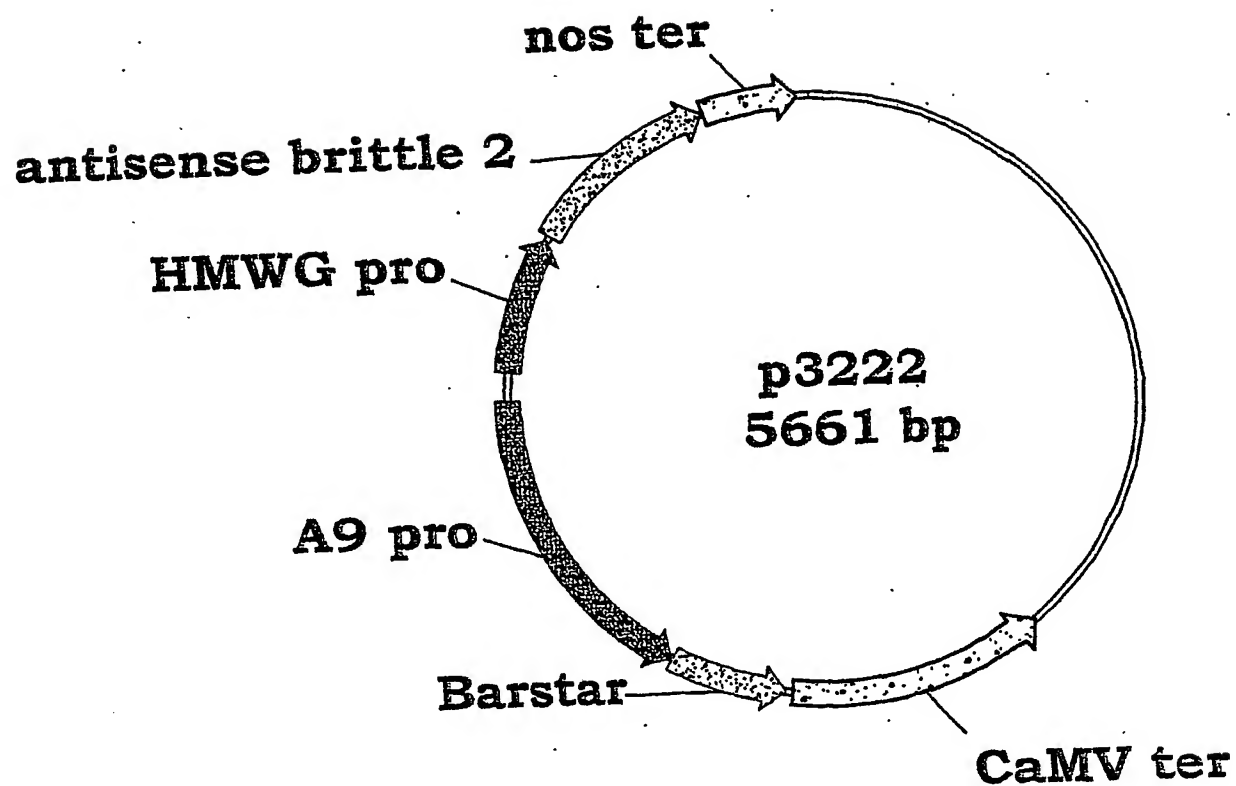


FIG.5

6/9

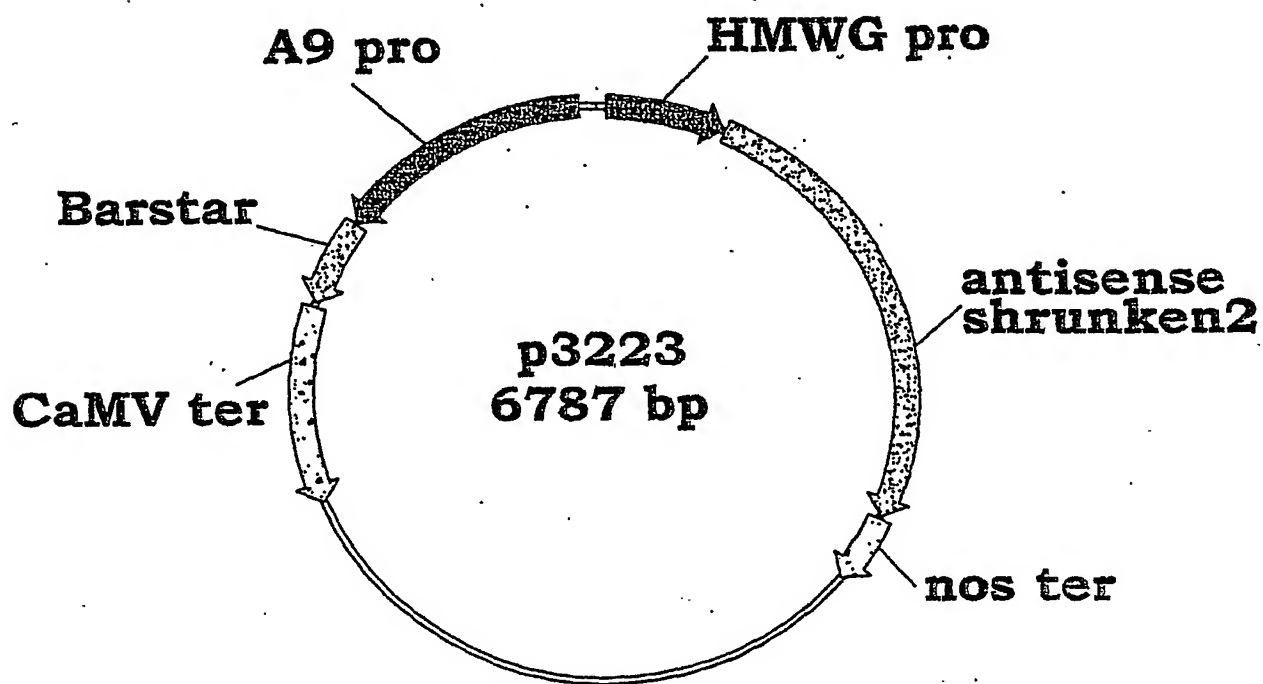


FIG.6

7/9

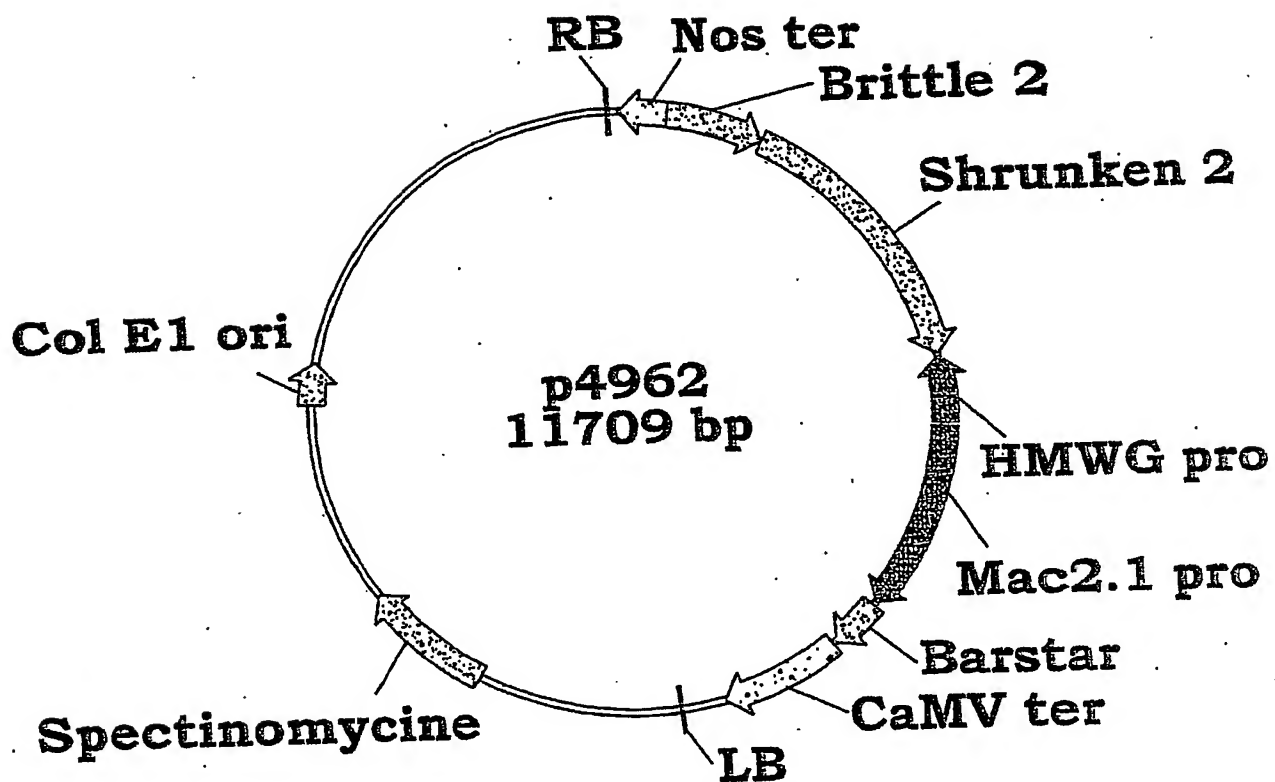


FIG.7

8/9

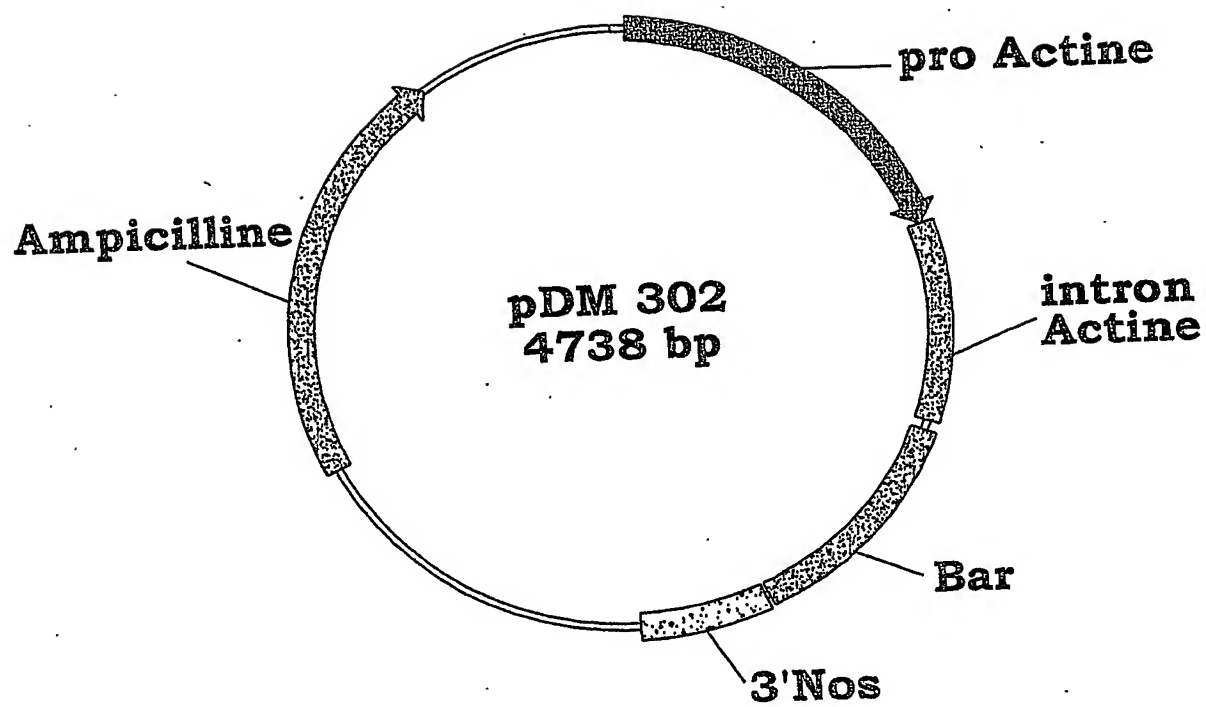
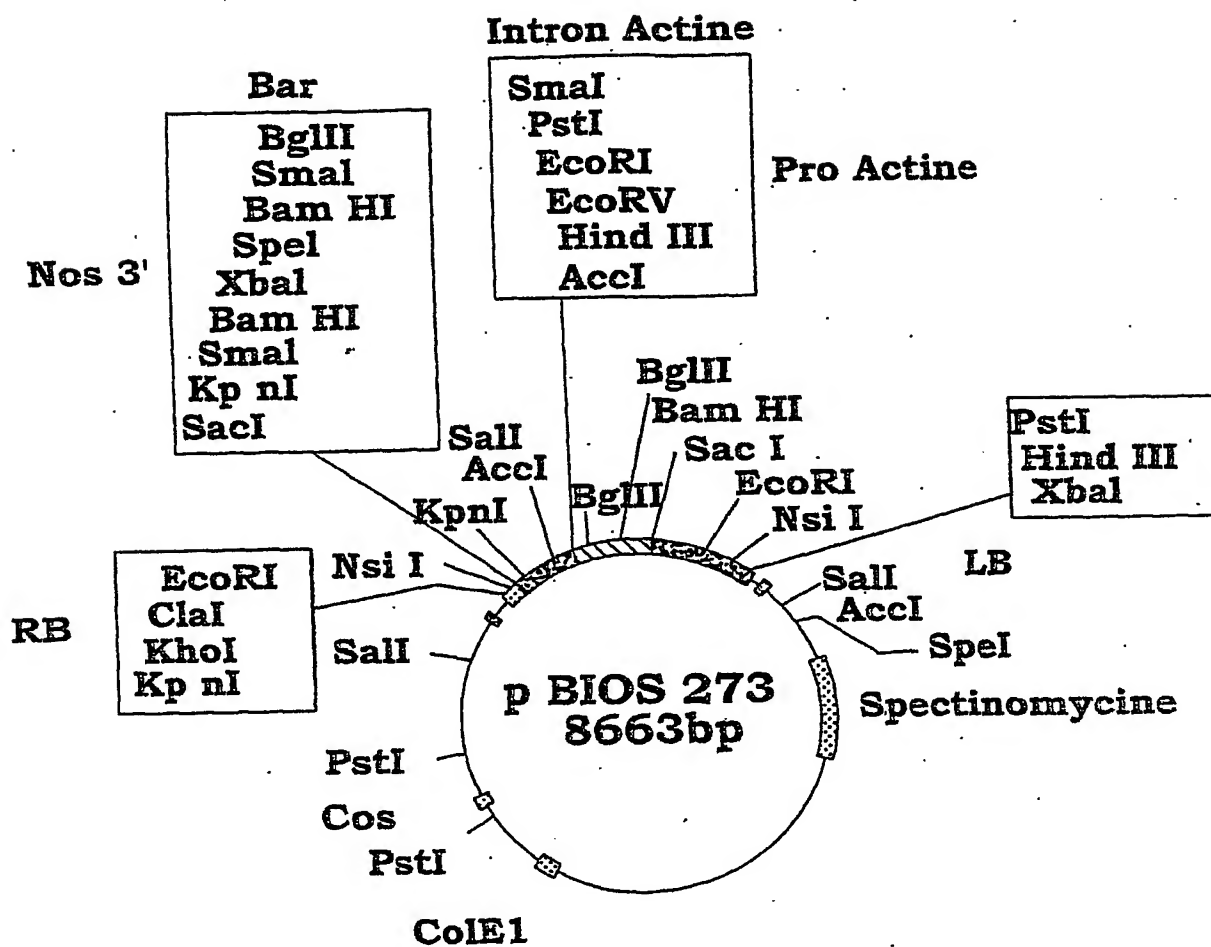


FIG.8

9/9

FIG.9

## SEQUENCE LISTING

<110> Biogemma

<120> Nouveau procédé de production de semences hybrides de maïs

<130> BET 03P0164

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificiel

<220>

<223> amorce PCR

<400> 1

ccggatccat gtgacagaca gtgtta

26

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificiel

<220>

<223> amorce PCR

<400> 2

aagcccggga cttgtactaa ctgtttc

27

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificiel

<220>

<223> amorce PCR

<400> 3

tatcggtacc aaatcataag aaaggag

27

<210> 4

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificiel

<220>

<223> amorce PCR

<400> 4

gaagatctat attgttcac ccattg

26

<210> 5

<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 5  
gcacccggga ggagatatgc agtttg

26

<210> 6  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 6  
gactgcagca caaatggtca ag

22

<210> 7  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 7  
tatcgatcc aaatcataag aaaggag

27

<210> 8  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 8  
gaagatctat attgttcac ccattg

26

<210> 9  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 9  
tagacattgt aggttggtt tg

22

<210> 10  
<211> 24



<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 10  
gcacaggtta tcaacacggt tgac

24

<210> 11  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 11  
atccggccat ttctgaagag aa

22

<210> 12  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 12  
tctagttact tcataagttt tg

22

<210> 13  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 13  
ttgcggggtt gtgtttccat attg

24

<210> 14  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificiel

<220>  
<223> amorce PCR

<400> 14  
attgataagg gggttattagg gg

22

<210> 15  
<211> 21  
<212> ADN

<213> Artificiel

<220>

<223> amorce PCR

<400> 15

ggtttcgctc atgtgttgag c

21

<210> 16

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificiel

<220>

<223> amorce PCR

<400> 16

cattgcggac gtttttaatg tactg

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00711

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C07K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CAB Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 34634 A (LEEMANS JAN ; WILLIAMS MARK (BE); PLANT GENETIC SYSTEMS NV (BE); KR) 21 December 1995 (1995-12-21) cited in the application the whole document	1-27
A	WO 99 04023 A (PIONEER HI BRED INT ; HOWARD JOHN A (US); ALBERTSEN MARC C (US)) 28 January 1999 (1999-01-28) the whole document --- -/-	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 August 2003

Date of mailing of the international search report

12/08/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00711

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BHAVE M ET AL: "Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 2, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 581-588, XP000652283 ISSN: 1040-4651 the whole document	
A	WO 95 34660 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;BURRELL MICHAEL MEYRICK (GB); COATES STEP) 21 December 1995 (1995-12-21) the whole document	
A	WO 92 11379 A (NICKERSON INT SEED) 9 July 1992 (1992-07-09) the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00711

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9534634	A	21-12-1995	AU 698942 B2	12-11-1998
			AU 2737995 A	05-01-1996
			CA 2191441 A1	21-12-1995
			WO 9534634 A2	21-12-1995
			EP 0764212 A1	26-03-1997
			JP 10504706 T	12-05-1998
			US 5880331 A	09-03-1999
WO 9904023	A	28-01-1999	US 5962769 A	05-10-1999
			AU 742366 B2	03-01-2002
			AU 7146098 A	10-02-1999
			BG 104154 A	31-08-2000
			BR 9811697 A	02-01-2002
			CN 1269837 T	11-10-2000
			EP 1000164 A1	17-05-2000
			HU 0002649 A2	28-12-2000
			JP 2001510052 T	31-07-2001
			NZ 502688 A	20-12-2002
			SK 712000 A3	14-08-2000
			TR 200000098 T2	21-11-2000
			WO 9904023 A1	28-01-1999
			ZA 9806087 A	16-05-2000
WO 9534660	A	21-12-1995	AU 711602 B2	14-10-1999
			AU 2625895 A	05-01-1996
			BR 9508700 A	12-08-1997
			CA 2192195 A1	21-12-1995
			CZ 9603668 A3	16-07-1997
			EP 0772682 A1	14-05-1997
			WO 9534660 A1	21-12-1995
			JP 10501967 T	24-02-1998
			PL 317836 A1	28-04-1997
			US 6486383 B1	26-11-2002
			US 6096945 A	01-08-2000
WO 9211379	A	09-07-1992	AT 219789 T	15-07-2002
			AU 654314 B2	03-11-1994
			AU 9133791 A	22-07-1992
			CA 2099125 A1	25-06-1992
			DE 69133048 D1	01-08-2002
			DE 69133048 T2	13-02-2003
			DK 564513 T3	14-10-2002
			EP 1213355 A2	12-06-2002
			EP 0564513 A1	13-10-1993
			ES 2179039 T3	16-01-2003
			WO 9211379 A1	09-07-1992
			JP 6507065 T	11-08-1994
			SG 54294 A1	16-11-1998
			US 5723754 A	03-03-1998

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No  
PCT/FR 03/00711

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C12N C07K A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CAB Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 34634 A (LEEMANS JAN ; WILLIAMS MARK (BE); PLANT GENETIC SYSTEMS NV (BE); KR) 21 décembre 1995 (1995-12-21) cité dans la demande le document en entier ----	1-27
A	WO 99 04023 A (PIONEER HI BRED INT ; HOWARD JOHN A (US); ALBERTSEN MARC C (US)) 28 janvier 1999 (1999-01-28) le document en entier ----- -/-	1-27

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 août 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/08/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Oderwald, H

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BHAVE M ET AL: "Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize"</p> <p>PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 2, 1 juin 1990 (1990-06-01), pages 581-588, XP000652283</p> <p>ISSN: 1040-4651</p> <p>le document en entier</p> <p>----</p>	
A	<p>WO 95 34660 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;BURRELL MICHAEL MEYRICK (GB); COATES STEP) 21 décembre 1995 (1995-12-21)</p> <p>le document en entier</p> <p>----</p>	
A	<p>WO 92 11379 A (NICKERSON INT SEED)</p> <p>9 juillet 1992 (1992-07-09)</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No

PCT/FR 03/00711

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9534634	A	21-12-1995	AU 698942 B2	12-11-1998
			AU 2737995 A	05-01-1996
			CA 2191441 A1	21-12-1995
			WO 9534634 A2	21-12-1995
			EP 0764212 A1	26-03-1997
			JP 10504706 T	12-05-1998
			US 5880331 A	09-03-1999
WO 9904023	A	28-01-1999	US 5962769 A	05-10-1999
			AU 742366 B2	03-01-2002
			AU 7146098 A	10-02-1999
			BG 104154 A	31-08-2000
			BR 9811697 A	02-01-2002
			CN 1269837 T	11-10-2000
			EP 1000164 A1	17-05-2000
			HU 0002649 A2	28-12-2000
			JP 2001510052 T	31-07-2001
			NZ 502688 A	20-12-2002
			SK 712000 A3	14-08-2000
			TR 200000098 T2	21-11-2000
			WO 9904023 A1	28-01-1999
			ZA 9806087 A	16-05-2000
WO 9534660	A	21-12-1995	AU 711602 B2	14-10-1999
			AU 2625895 A	05-01-1996
			BR 9508700 A	12-08-1997
			CA 2192195 A1	21-12-1995
			CZ 9603668 A3	16-07-1997
			EP 0772682 A1	14-05-1997
			WO 9534660 A1	21-12-1995
			JP 10501967 T	24-02-1998
			PL 317836 A1	28-04-1997
			US 6486383 B1	26-11-2002
WO 9211379	A	09-07-1992	US 6096945 A	01-08-2000
			AT 219789 T	15-07-2002
			AU 654314 B2	03-11-1994
			AU 9133791 A	22-07-1992
			CA 2099125 A1	25-06-1992
			DE 69133048 D1	01-08-2002
			DE 69133048 T2	13-02-2003
			DK 564513 T3	14-10-2002
			EP 1213355 A2	12-06-2002
			EP 0564513 A1	13-10-1993
			ES 2179039 T3	16-01-2003
			WO 9211379 A1	09-07-1992
			JP 6507065 T	11-08-1994
			SG 54294 A1	16-11-1998
			US 5723754 A	03-03-1998



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**